

Entwicklung und Evaluierung eines Testsystems
zur Untersuchung der rekombinogenen Potenz
mutagener Substanzen
in *Chlamydomonas reinhardtii*

von

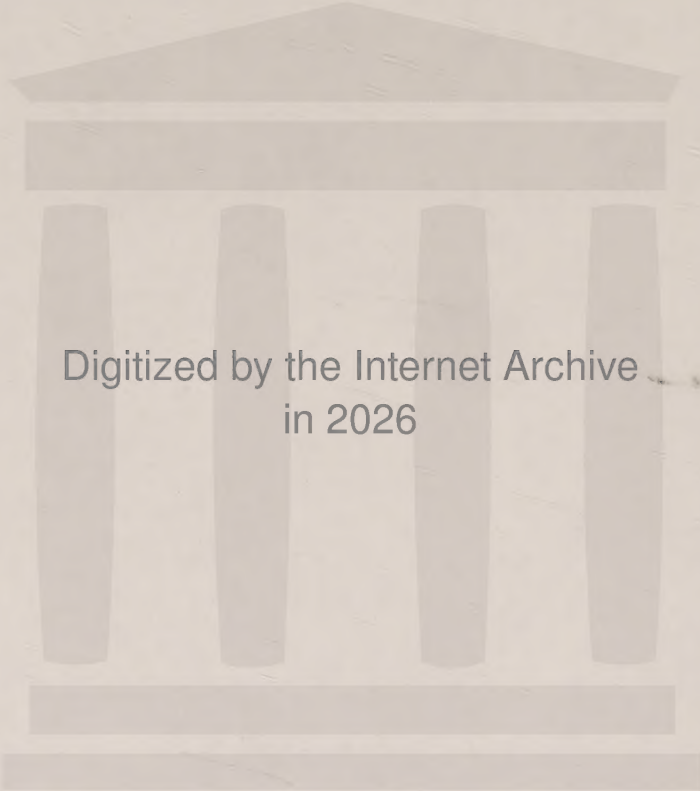
Annekathrin Preidel
geb. Waechter

aus

Göttingen

*Diss.
Erlangen
1984*

1985 # 88



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546208_0022

**Entwicklung und Evaluierung eines Testsystems
zur Untersuchung der rekombinogenen Potenz
mutagener Substanzen
in Chlamydomonas reinhardtii**

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

**Annekathrin Preidel
geb. Waechter**

aus

Göttingen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1984

Vorsitzender der

Promotionskommission:

Prof. Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatte:

Priv. Doz. Dr. O. Schimmer

Zweitberichterstatte:

Prof. Dr. C. G. Arnold

Meinem Lehrer, Herrn Priv. Doz. Dr. O. Schimmer, möchte ich für die Anregung dieser Arbeit und seine Unterstützung bei ihrer Durchführung danken. Ihm sowie Herrn Prof. Dr. C. G. Arnold und Frau Dr. G. Abel gilt mein besonderer Dank für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Ebenso danke ich dem Universitätsbund der Universität Erlangen-Nürnberg für die finanzielle Unterstützung bei der Anschaffung des Hydrosolständers mit Zubehör und der Vakuumpumpe.

Verwendete Abkürzungen und Symbole

c	=	Konzentration
CPA	=	Cyclophosphamid
DMN	=	Dimethylnitrosamin
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EMS	=	Ethylmethansulfonat
ENU	=	Ethylnitrosourestoff
MMS	=	Methylmethansulfonat
MNNG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosourea
rel. RR	=	relative Rekombinationsrate
rel. UR	=	relative Überlebensrate
SA	=	Standardabweichung

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.	Einleitung
1.1.	Problemstellung der Arbeit
1.2.	Stand der Forschung
1.2.1.	Literaturübersicht
1.2.2.	Genetischer Hintergrund
1.2.3.	Möglichkeiten der genetischen Analyse
2.	Material und Methoden
2.1.	Stämme
2.2.	Medien
2.2.1.	Standardlösungen
2.2.2.	Medienzusammensetzung
2.3.	Beschreibung des Systems
2.3.1.	Anzucht der vegetativen Kulturen
2.3.2.	Induktion der Gametogenese
2.3.3.	Kreuzung
2.3.4.	Zygotenreifung
2.3.5.	Induktion des synchronen Ablaufs der Meioseprozesse
2.3.6.	Zygotenzählung
2.3.7.	Filtrationsmethode
2.3.8.	Behandlung
2.3.8.1.	Behandlungszeitpunkt
2.3.8.2.	Behandlungsmodus
2.3.9.	Auswertung

3.	Wahl und Anwendungsbedingungen der Testsubstanzen	26
3.1.	Alkylierende Agentien	28
3.1.1.	Nitrosoverbindungen	28
3.1.1.1.	Nitrosamide	28
3.1.1.1.1.	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	29
3.1.1.1.2.	Ethylnitrosoharnstoff (ENU)	31
3.1.1.1.3.	Kombinationsversuche von ENU und Coffein	32
3.1.1.2.	Nitrosamine	33
3.1.1.2.1.	Dimethylnitrosamin (DMN)	33
3.1.2.	Alkylalkansulfonate	35
3.1.2.1.	Alkylmethansulfonate	35
3.1.3.	Cyclische alkylierende Verbindungen	36
3.2.	Nicht - alkylierende Verbindungen	39
3.2.1.	Natriumnitrit	39
3.2.2.	Radikalbildende Substanzen	40
3.2.2.1.	Wasserstoffperoxid	41
3.2.2.2.	Azobisisobutyronitril	41
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Einfluß von MNNG und ENU auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate	42
4.2.	Einfluß von Coffein auf die dosisabhängigen Effekte von ENU	49
4.3.	Einfluß von Dimethylnitrosamin auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate	52

4.4.	Einfluß von Methylmethansulfo- nat und Ethylmethansulfonat auf die relative Überlebens- und Re- kombinationsrate	55
4.5.	Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebens- und Re- kombinationsrate	61
4.6.	Einfluß von Natriumnitrit auf die relative Überlebens- und Rekombi- nationsrate	64
4.7.	Einfluß der radikalbildenden Sub- stanzen	68
5.	Diskussion	71
6.	Zusammenfassung	97
7.	Literaturverzeichnis	99

1. Einleitung

1.1. Problemstellung der Arbeit

Ein Schwerpunkt der Mutagenitätsforschung ist, das Wirkungsspektrum natürlich vorkommender und synthetischer chemischer Substanzen im Hinblick auf ihre Genotoxizität zu erfassen. Genotoxizität resultiert aus der Fähigkeit einer Substanz, mit der DNA in Wechselwirkung zu treten oder mit ihr chemisch zu reagieren. Das kann für das Erbgut des Organismus, in dem die Substanz appliziert wird, mutagene, rekombinogene, klastogene oder kanzerogene Effekte zur Folge haben. Um das genotoxische Potential chemischer Substanzen zu bestimmen, kann man diese:

- a) in unterschiedlichen Organismen mit unterschiedlicher DNA - Organisation und unterschiedlichen Stoffwechsel- und damit Aktivierungsbedingungen

oder

- b) innerhalb eines Organismus auf verschiedene genetische Endpunkte hin untersuchen.

Für derartige Untersuchungen ist eine Vielzahl von Kurzzeittestsystemen, unter anderem mit Mikroorganismen, entwickelt worden (Hollstein und McCann 1979). Mit solchen mikrobiellen Testsystemen erhält man im Gegensatz zu Langzeittierversuchen zeitsparend und mit einem geringeren Kosten- und Arbeitsaufwand sowie einer besser gesicherten statistischen Aussagekraft Informationen über die Genotoxizität solcher Substanzen.

An prokaryotischen Testorganismen werden insbesondere die Bakterien *Salmonella typhimurium* (Ames et al. 1975), *Escherichia coli* (Mohn et al. 1980) und *Bacillus subtilis* (MacGregor und Sacks 1976) verwendet. Eukaryotische Mikroorganismen bieten diesen gegenüber den Vorteil einer höher entwickelten DNA - Organisation in Chromosomen, wie man sie auch bei Säugerzellen findet. Außerdem können bei ihnen haploide und diploide Zellzyklusphasen in genetische Tests einbezogen werden. Organismen etablierter Testsysteme sind vor allem Ascomyceten: *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmermann 1973), *Schizosaccharomyces pombe* (Loprieno et al. 1974) sowie *Neurospora crassa* (De Serres und Malling 1971) und *Aspergillus nidulans* (Roper 1971).

Algen, ebenfalls eukaryotische Mikroorganismen, werden als Testorganismen selten verwendet. Hier hat nur ein Testsystem mit *Chlamydomonas reinhardtii* Bedeutung erlangt, das auf der Reversion nukleärer und extranukleärer Mutanten zum Wildtyp beruht (Degraeve 1973; Schimmer 1977; Schimmer und Hauber 1977; Schimmer 1980).

Chlamydomonas reinhardtii ist ein geeignetes Objekt für genetische Studien. Es handelt sich um einen einzelligen Organismus aus der Familie der Chlamydomonadaceae, der sich sowohl photoautotroph als auch heterotroph und mixotroph ernähren kann. Seine nukleäre DNA liegt auf 16 Kopplungsgruppen (O'Brien 1982). Darüber hinaus verfügt *Chlamydomonas reinhardtii* auch über extranukleäre DNA (Arnold 1970), deren Gene in genetische Tests einbezogen werden können.

Abbildung 1 zeigt den Lebenszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Vermehrung von *Chlamydomonas reinhardtii* im vegetativen Zyklus, in dem auch das oben genannte Testsystem

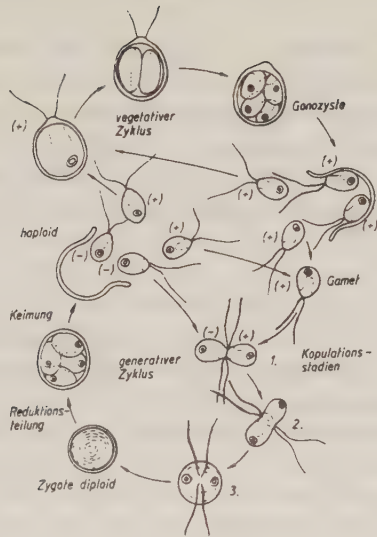


Abb. 1 : Lebenszyklus von *Chlamydomonas reinhardtii*
(aus Günther 1978)

durchgeführt wird, beruht auf mitotischen Teilungen. Die Nachkommen tragen unter normalen Bedingungen dieselbe genetische Information wie die Eltern. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen kann die Gametogenese eingeleitet werden, die den Übergang zum generativen Zyklus darstellt. Die dabei entstehenden isogamen Gameten, die sich nur in ihrem Paarungstyp unterscheiden, bilden durch Kopulation diploide Zygoten. Diese entwickeln sich innerhalb

einer Reifungsphase zu dickwandigen Zygoten, die etwa doppelt so groß sind wie die vegetativen Zellen. Wird in den reifen Zygoten die Meiose induziert, so entstehen durch Reduktionsteilung jeweils vier haploide Tochterzellen, die auch als Meiosporen bezeichnet werden. Diese können aufgrund rekombinogener Prozesse während der Reduktionsteilung das elterliche Erbgut in einer neuen Kombination erhalten und so neben den elterlichen neue Eigenschaften aufweisen.

Im Gegensatz zu haploiden Organismen wie *Chlamydomonas reinhardtii* kann es in diploiden Organismen auch während der mitotischen Teilungen durch Genkonversion oder mitotisches Crossing - over zu einer Neukombination des Erbguts kommen. Diese spontane mitotische Rekombination tritt allerdings viel seltener auf als die spontane meiotische Rekombination. Nach Thornton und Johnston (1971) und Game et al. (1980) ist die mitotische Rekombinationsrate bei *Saccharomyces cerevisiae* 1000fach geringer als die meiotische. Dagegen ist die Spontanrate der mitotischen Rekombination bei *Saccharomyces cerevisiae* 100-1000fach höher als die spontane Mutationsrate (Kunz und Haynes 1981).

Da die Rate der spontanen mitotischen Rekombination durch Mutagene beeinflusst werden kann, wird sie als biologischer Parameter in einem Testsystem mit speziell konstruierten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Zimmermann 1973; Zimmermann et al. 1975). Dieses Testsystem hat insbesondere auch deswegen in jüngster Zeit Bedeutung erlangt, als Wasmuth und Vock Hall (1984) zeigen konnten, daß mitotische Rekombination auch in Säugerzellen auftritt und durch mutagene Stoffe beeinflusst werden kann, wobei sich hier die Effekte in Säugern mit denen in Saccha-

Saccharomyces cerevisiae korrelieren lassen (Fahrig 1984).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob durch die Einbeziehung der meiotischen Rekombinationsrate als biologischem Parameter für die Untersuchung von Effekten mutagener Substanzen eine bessere Ausgangsbasis für die Abschätzung des Risikos genotoxischer Substanzen geschaffen werden kann. Die vorliegende Arbeit hat zwei Schwerpunkte. Zunächst sollte eine Standardmethode für ein routinemäßig durchführbares Testsystem mit *Chlamydomonas reinhardtii* entwickelt werden, mit dem dosisabhängige Effekte mutagener Substanzen auf die meiotische Rekombinationsrate erfaßt werden können. In einem zweiten Teil sollten zur Evaluierung des Testsystems Effekte ausgewählter Mutagene von unterschiedlicher chemischer Natur und Wirkungsweise untersucht werden.

1.2. Stand der Forschung

1.2.1. Literaturübersicht

Dosis - Effekt - Studien zur rekombinogenen Wirkung von Mutagenen sind insbesondere an *Saccharomyces cerevisiae* und hier vor allem zur Wirkung auf die mitotische Rekombination durchgeführt worden (Zimmermann et al. 1966; Zimmermann und v. Laer 1967; Zimmermann und Schwaier 1967; Yost et al. 1967; Zimmermann 1971; Davies et al. 1975; Fahrig 1976, 1979, 1982). Daneben wurden von Holliday (1964) auch an *Ustilago maydis* und von Bignami et al. (1977) an *Aspergillus nidulans* dosisabhängige Effekte auf die mito-

tische Rekombinationsrate gemessen. Machida und Nakai (1980), Kelly und Parry (1983) sowie Kelly et al. (1983) haben die Wirkung von Mutagenen auf die meiotische Rekombinationsrate in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

Auch zur intergenischen Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* während der Meiose liegen bereits Untersuchungen vor. Diese beschäftigen sich insbesondere mit deren Mechanismus. In frühen Arbeiten untersuchen Eversole (1956) und Levine und Ebersold (1958) den Einfluß der Ionenzusammensetzung des Mediums auf die Crossing - over - Häufigkeit. Von Lawrence und Davies sind in den 60er Jahren weitere Arbeiten erschienen. Ziel dieser Untersuchungen war es, die molekularen Prozesse während der Meiose und den damit verbundenen Rekombinationsmechanismus weiter aufzuklären. Während der prämeiotischen Interphase und der Meiose wurden in definierten Zeitintervallen γ - Strahlen (Lawrence 1965 a, b, 1967), DNA - Syntheseinhibitoren (Davies und Lawrence 1967) sowie Proteinsyntheseinhibitoren (Lawrence und Davies 1967) angewendet und deren Wirkung auf die Rekombinationsrate untersucht. Während die Proteinsyntheseinhibitoren in allen Meiosestadien die Rekombinationsrate unspezifisch senken, beeinflussen die DNA - Syntheseinhibitoren die Rekombinationsrate spezifisch in entweder nur einer oder in zwei Phasen der Meiose. Die erste empfindliche Phase vor Beginn der meiotischen Prophase dauert von 5 - 5 1/2 Stunden, die zweite empfindliche Phase von 6 - 6 1/2 Stunden nach Induktion der Meiose in den reifen Zygoten. Bei der Behandlung der Zygoten mit γ - Strahlen fand Lawrence (1965 a) ebenfalls, daß in diesen beiden Phasen die Rekombinationsrate spezifisch beeinflußt werden kann. Die erste Phase interpretiert er als Präleptotän, in der die Re-

kombinationsrate gesenkt wird, die andere als Zygotän, in der eine Erhöhung der Rekombinationsrate bei γ -Bestrahlung in nicht - toxischen Konzentrationen erfolgt. In beiden Phasen kann er auch dosisabhängige Effekte feststellen (Lawrence 1965 b, 1970; Lawrence und Holt 1970). Sueoka et al. (1967) untersuchten die chromosomale DNA - Replikation während der Meiose. Ihre Experimente zeigen, daß während der Zygotenreifung keine Replikation der DNA erfolgt, sondern erst während der Meiose. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit das Zeitintervall von 6 - 6 1/2 Stunden nach Induktion der Meiose für die Behandlung der Zygoten mit Mutagenen gewählt.

In *Chlamydomonas reinhardtii* haben darüber hinaus Chiu und Hastings (1973) die Beziehung zwischen prämeiotischer DNA - Synthese und Rekombination genauer untersucht, indem sie DNA - Syntheseinhibitoren eingesetzt haben und versucht haben, ihre spezifischen Effekte auf die Rekombination zu klären. Gleichzeitig konnten sie durch ^{32}P - Inkorporationsexperimente die DNA - Synthese zeitlich auf 6 1/2 - 7 Stunden nach Meioseinduktion festlegen.

Von Davies (1966) wurden vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von einem monofunktionellen Agens (Diethylsulfat) und einem bifunktionellen Stickstofflost - Derivat während der Meiose durchgeführt. Diese wurden in jeweils zwei Konzentrationen und in ebenfalls definierten Zeitintervallen eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß nicht nur bifunktionelle Agentien, die in der Lage sind, Crosslinks zu bilden, sondern auch monofunktionelle Agentien die Rekombinationsrate beeinflussen.

1.2.2. Genetischer Hintergrund

Nach der dritten Mendel'schen Regel werden Gene unabhängig voneinander vererbt (Abb. 2). Parentale und rekombi-

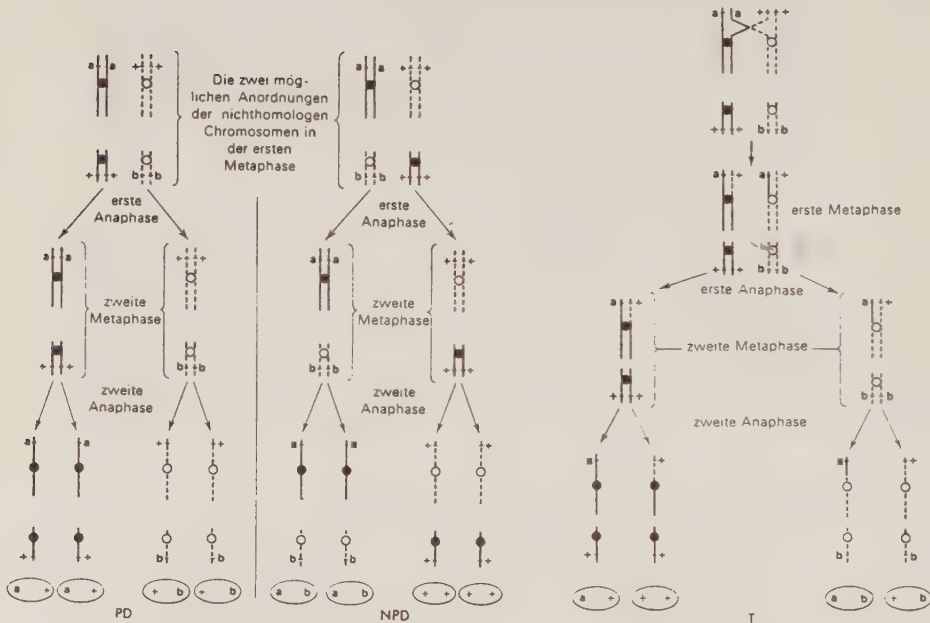


Abb. 2 : Schema der Segregation ungekoppelter Gene
(nach Levine 1966)

PD = Parental - Dityp

NPD = Nonparental - Dityp

T = Tetratyp

a, b = mutierte Genorte

nante Typen entstehen in der Tochtergeneration im Verhältnis 1 : 1. Diese Unabhängigkeitsregel gilt nur für Gene, die auf verschiedenen Kopplungsgruppen liegen. Ist dieses nicht der Fall, so spricht man von Genkopplung. Hier kann es zur Rekombination zwischen den gekoppelten Genen durch den Prozeß des Crossing - overs kommen (Abb. 3). Rekombinante Typen treten hier seltener auf als die nicht - rekombinanten Elterntypen. Die höchstmögliche Rekombina-

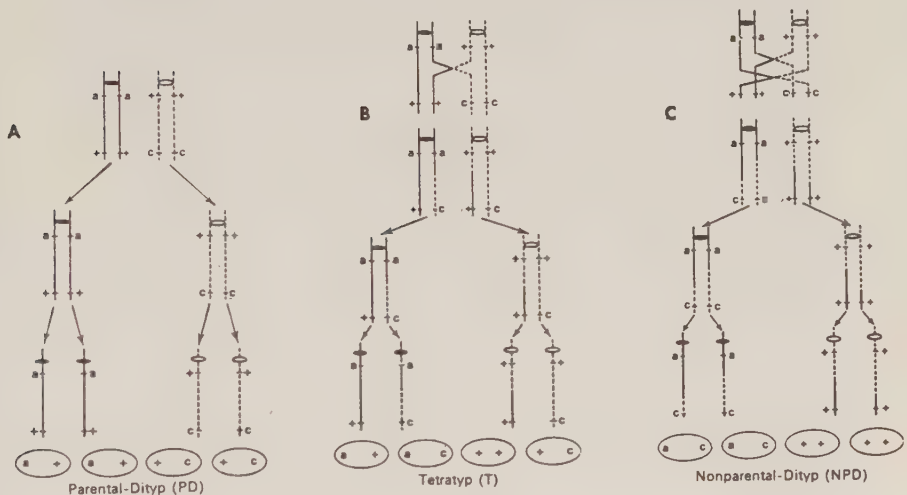


Abb. 3 : Schema der Segregation von gekoppelten Genen
(nach Levine 1966)

a, c = mutierte Genorte

tionshäufigkeit zwischen gekoppelten Genen, die weniger als 50 Karteneinheiten voneinander entfernt sind, beträgt weniger als 50 %.

1.2.3. Möglichkeiten der genetischen Analyse

Für die genetische Analyse der Meioseprodukte von Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* bieten sich prinzipiell zwei verschiedene Techniken an (Levine und Ebersold 1960):

- a) die Tetradenanalyse
- b) die Zygotenplatierungsmethode.

Bei der Tetradenanalyse werden die reifen Zygoten auf einem Agarfestmedium mit Hilfe eines Mikromanipulators vereinzelt. Nach deren Keimung werden die Meiosporen voneinander getrennt, so daß sie isoliert anwachsen können. Anschließend werden sie auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht (Ebersold 1956).

Vorversuche zu dieser Arbeit zeigten, daß diese Methode einen synchronen Ablauf der Meiosestadien in einer großen Anzahl von Zygoten nicht ermöglicht, da die mikroskopische Isolierung zeitaufwendig ist und sich nicht unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen durchführen läßt. Darüber hinaus ist die Zahl der Zygoten, die innerhalb eines Experiments untersucht werden können auf 100 begrenzt. Diese Faktoren führen dazu, daß die statistische Aussagekraft der Experimente eingeschränkt ist und die Ergebnisse bei einer Behandlung der Zygoten mit Mutagenen nicht reproduzierbar sind.

Alternativ zu dieser Methode können die Zygoten nach ent-

sprechender Verdünnung der Zygotensuspension in einer definierten Anzahl auf einem Agarfestmedium platiert werden, auf dem sie unter konstanten Bedingungen die Meiosestadien durchlaufen und keimen können. Die Meioseprodukte einer Zygote werden nicht voneinander getrennt. Ihre vegetativen Nachkommen bilden eine Zygotenkolonie und werden in ihrer Gesamtheit auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht.

Die Zygotenplatierungsmethode ermöglicht es, eine große Anzahl von Zygoten auch unter dem Einsatz chemischer Substanzen auf Rekombinationsereignisse hin zu untersuchen. Sie wurde deswegen in die Entwicklung des Testsystems mit einbezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Stämme

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Kreuzungen mit zwei Mutantenstämmen von *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt, die beide argininauxotroph sind. Es handelt sich dabei um die Stämme arg 1 (Paarungstyp mt -) und arg 7 (Paarungstyp mt +). Die Argininbedürftigkeit beider Stämme ist kernkodiert. Aufgrund von Rekombinationsanalysen (Loppes 1969 a) weiß man, daß die beiden mutierten Genorte dieser Stämme auf der Kopplungsgruppe I liegen und sechs Karteneinheiten voneinander entfernt sind (Ebersold und Levine 1959; O'Brien 1982). Die Segregation der Meioseprodukte nach der Kreuzung der Stämme arg 1 und arg 7 verläuft also nach den Gesetzmäßigkeiten der Segregation von gekoppelten Genen (Abb. 3, S.9). Der Wert für die spontane Rekombinationsrate liegt nach eigener Bestimmung mit der Zygotenplattierungsmethode bei $45,7 \pm 2,8 \%$.

Die Stämme arg 1 und arg 7 sind gut charakterisiert. Die Argininauxotrophie des arg 1 - Stamms beruht auf dem Ausfall des Enzyms Acetylglutamylphosphatreduktase (Hudock und Rosen 1976) und wurde nach Angaben des *Chlamydomonas* Stock Centers der Duke University, Durham von Levine mit kurzzeitigem UV induziert. Dem arg 7 - Stamm, von Gillham (1965) mit $50 \mu\text{g/ml}$ MNNG induziert, fehlt das Enzym Argininosuccinatlyase (Strijkert und Sussenbach 1969). Die beiden Stämme können durch Zusatz von $10 \mu\text{g/ml}$ Arginin zum Standardminimalmedium, die arg 1 - Mutante

alternativ auch mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Ornithin oder Citrullin wachsen.

Die Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Elizabeth Harris vom Chlamydomonas Stock Center der Duke University, Durham zur Verfügung gestellt.

2.2. Medien

2.2.1. Standardlösungen

(nach Loppes 1969 b)

Lösung A

NH_4Cl	8,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Aqua dest.	1000 ml

Lösung A - N

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Aqua dest.	1000 ml

Phosphatpuffer

KH_2PO_4	7,26 g
K_2HPO_4	14,34 g
Aqua dest.	1000 ml

Spurenelementlösung

EDTA	5,0 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,2 g
H_3BO_3	1,14 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,51 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,49 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,16 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,11 g
Aqua dest.	100 ml

Magnesiumsulfatlösung

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	24,6 g
Aqua dest.	100 ml

Die Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.2.2. Medienzusammensetzung

	M	A 50	M-N	M4-N	P 1+2
Lösung A	50 ml	50 ml	-	-	-
Phosphatpuffer	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	100 ml
Spurenelement- lösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
MgSO ₄ - Lösung	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
Lösung A-N	-	-	50 ml	50 ml	-
Aqua dest.	900 ml	900 ml	900 ml	900 ml	200 ml
Arginin · HCl	-	50 mg	-	-	-
Difco - Agar	20 g	20 g	20 g	40 g	-

M = Minimalmedium nach Loppes (1969 b)

A 50 = Argininmedium

M-N }
M4-N } = stickstofffreies Minimalmedium

P 1+2 = verdünnte Pufferlösung

2.3. Beschreibung des Systems

Das Testsystem, das in dieser Arbeit entwickelt werden sollte, gliedert sich methodisch in mehrere experimentelle Schritte. Um den Einfluß mutagener Substanzen auf die meiotische Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* untersuchen zu können, wurden Methoden kombiniert. Teilweise sind diese bereits eingeführt und wurden für die vorliegenden Experimente abgewandelt und standardisiert, teilweise wurden sie für das Testsystem neu entwickelt.

2.3.1. Anzucht der vegetativen Kulturen

Für die Anzucht der Stämme werden jeweils Zellen von einem 5 Tage alten Klon auf Argininmedium ausgestrichen. Diese wachsen 5 weitere Tage im Dauerlicht (Weißlicht, ca. 5000 Lux Beleuchtungsstärke) bei einer Temperatur von 298 K an.

2.3.2. Induktion der Gametogenese

Die Standardbedingungen für die Induktion sexueller Aktivität in vegetativen Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* sind von Sager und Granick (1954) sowie Kates und Jones (1964) ausgearbeitet worden. Vorversuche zeigten, daß sich diese auf die Gametogenese in den für diese Arbeit ausgewählten Mutantenstämmen übertragen lassen.

Die Konzentration von Stickstoffsalzen wie Nitrit-, Ni-

trat- und Ammoniumverbindungen ist der kontrollierende Faktor für den Übergang vom vegetativen zum generativen Zyklus. Ein Abbau oder Entzug der Stickstoffquelle leitet die Gametenbildung ein, wobei die Differenzierungsperiode 16 - 18 Stunden dauert (Chiang et al. 1970).

Für die vorliegenden Untersuchungen werden die angezogenen vegetativen Zellen nach der Methode von Martin und Goodenough (1975) jeweils auf ein stickstofffreies Fest-minimalmedium (M-N) übertragen. Nach 18 Stunden, während derer die Kulturen im Dauerlicht bei 298 K gehalten werden, werden sie in gleichen Volumina verdünnter Pufferlösung (P 1+2) suspendiert, damit sich Geißeln ausbilden können, und für eine weitere Stunde im Dauerlicht (Licht-ring Philips Radium NL 32W/32C, ca. 20 000 Lux) unter Standardbedingungen gehalten. Vor der Kreuzung wird durch mikroskopische Zellzählung (Zellkammer Fuchs - Rosenthal Precicolor HBG West-Germany) die Gametenzahl beider Al-gensuspensionen festgestellt, und die Suspensionen werden auf dieselbe Gametenzahl von 10^6 Gameten/ml eingestellt.

2.3.3. Kreuzung

Anschließend werden beide Suspensionen zusammengegeben, so daß es nun zur Kopulation der Gameten kommen kann. Die Suspension wird wiederum eine Stunde unter Standardbedingungen im Dauerlicht (Lichtring Philips Radium, wie oben) gehalten. Zwischen den jungen Zygoten, die sich während dieser Zeit gebildet haben, entsteht nach einer Stunde im Flüssigmedium eine Substanz, die die Zygoten miteinander verklebt. Sie verklumpen zu großen Zygotenaggre-

gaten, die nicht mehr voneinander getrennt werden können. Die chemische Zusammensetzung dieser Substanz, die auch von anderen Autoren beschrieben wird (Sager 1955; Catt 1979), ist nicht bekannt. Für die folgenden Untersuchungen ist es wichtig, daß die Zygoten einzeln vorliegen. Um die Bildung der Zygotenaggregate zu unterbinden, wird die Kreuzung nach einer Stunde unterbrochen, obwohl zu diesem Zeitpunkt keine 100 %ige Kreuzungsrate erreicht ist, also noch viele Gameten ungepaart sind.

Die Suspension wird hierzu in 5 ml - Portionen aufgeteilt und abzentrifugiert (2000 Umdrehungen/min). Das Pellet, das Zygoten und ungepaarte Gameten enthält, wird auf ein stickstofffreies Festmedium, das mit 4 % Agar versehen ist (M4-N), gegeben. Nachdem die restliche Flüssigkeit auf der Agaroberfläche verdunstet ist, werfen die Gameten, die noch nicht kopuliert haben, die Geißeln ab, so daß eine weitere Zygotenbildung auf diese Weise unterbunden wird. Eine Trennung der Zygoten von den ungepaarten Gameten erfolgt erst nach der Reifung der Zygoten.

2.3.4. Zygotenreifung

Zur Reifung werden die Zygoten auf dem stickstofffreien Medium zunächst 24 Stunden im Dauerlicht (5000 Lux) bei 298 K, anschließend 5 Tage bei 298 K unter absolutem Lichtabschluß gehalten (Sager und Granick 1954). In dieser Zeit reifen die Zygoten, wobei vier wesentliche Veränderungen ablaufen (Cavalier-Smith 1976):

1. Die Zygoten nehmen erheblich an Größe zu. (Nach eigenen Messungen sind die vegetativen Zellen der Mutan-

tenstämme 7,2 - 8,0 μm lang, die Gameten etwas kleiner (4,8 - 7,2 μm lang), und die reifen Zygoten haben einen Durchmesser von 10,0 - 16,8 μm .)

2. Die Zygotenwand verändert sich in ihrer Dicke und Zusammensetzung (Catt 1979) und hat damit einen deutlich anderen Charakter als die Wand der vegetativen Zellen.

3. Chlorophyll und die inneren Membranen der Chloroplasten werden abgebaut. Die reifen Zygoten sind orange - braun gefärbt.

4. Es werden Speicherprodukte (Stärke, Pyrenoide) gebildet.

2.3.5. Induktion des synchronen Ablaufs der Meioseprozesse

Um in den gereiften Zygoten die Meiose zu induzieren, müssen ihnen gleichzeitig Licht und eine Stickstoffquelle wieder angeboten werden. Konstante Temperatur- und Lichtbedingungen ermöglichen einen synchronen Ablauf der molekularen Prozesse während der ersten 6 - 9 Stunden nach Meioseinduktion (Levine und Ebersold 1958). Vorversuche zeigten, daß diese Synchronität besonders wichtig ist, um die Zygoten alle in demselben empfindlichen Stadium mit den Mutagenen behandeln zu können.

Vor der Meioseinduktion müssen die ungepaarten Gameten, die sich neben den gereiften Zygoten auf dem Festmedium befinden, abgetrennt werden. Dafür bieten sich mehrere methodische Möglichkeiten, die auf den besonderen Eigenschaften der reifen Zygoten, ihrer Größe und Wanddicke, beruhen, die sie von den vegetativen Zellen und Gameten

unterscheiden.

Die meisten Autoren geben für die Abtötung von Gameten eine Methode an, bei der die Petrischalen mit dem Reifungsmedium, auf dem sich Gameten und reife Zygoten befinden, 60 Sekunden über Chloroformdämpfe gehalten werden. Eigene Untersuchungen zeigten jedoch, daß diese Methode nicht effektiv genug ist, da noch ein großer Teil der Gameten überlebt.

Eine wirkungsvollere Möglichkeit stellt die Abtötung der Gameten durch Hitzeschock dar, die Lewin (1957) für Experimente mit *Chlamydomonas moewusii* beschreibt. Diese Methode wurde bei der Entwicklung des Testsystems abgewandelt und integriert. Dazu werden die Zygoten und ungepaarten Gameten mit einem gebogenen Spatel von der Agaroberfläche abgekratzt und in 5 ml verdünnter Pufferlösung (P 1+2) resuspendiert. Die Suspension wird für 45 Sekunden bei einer Temperatur von 328 K im Wasserbad gehalten. Die durch ihre Wand geschützte Zygote überlebt im Gegensatz zu den Gameten diesen Temperaturschock.

Eine dritte Möglichkeit besteht in der Trennung der Zygoten von den Gameten durch Filtration. Da die Zygoten etwa doppelt so groß sind wie die Gameten, kann man sie auf Filtern geeigneter Porengröße anreichern, während die Gameten entfernt werden.

Um eine sichere Isolierung der Zygoten zu erreichen, wurde für die vorliegenden Experimente eine Kombination der drei Methoden gewählt.

2.3.6. Zygotenzählung

Nach der Chloroform- und Temperaturschockbehandlung wird die Zygotenkonzentration der Suspension mikroskopisch mit der Fuchs - Rosenthal - Zählkammer festgestellt. Gleichzeitig wird bei dieser Zählung die Qualität der Zygoten beurteilt. Es wurden jeweils nur solche Zygoten für die Experimente verwendet, die einen gleichmäßigen Durchmesser von 10,0 - 16,8 μm aufwiesen und einheitlich braun gefärbt waren, also kein Chlorophyll mehr enthielten (Cavalier-Smith 1976). Darüber hinaus wurden die Experimente nur mit Zygoten durchgeführt, die nicht zu Zygotenaggregaten verklebt waren.

Bei diesem methodischen Schritt wurde auch die Effektivität der Gametenabtötung kontrolliert. Kriterien hierfür waren Form und Geißelbewegung der Gameten. Durch die Abtötung werfen die Gameten ihre Geißeln ab und bekommen eine unregelmäßige äußere Form.

2.3.7. Filtrationsmethode

Für die Meioseinduktion durch Überführung der Zygoten auf ein stickstoffhaltiges Medium (A 50) wurde eine von Lawrence und Davies (1967) beschriebene Filtrationsmethode weiterentwickelt. Diese ermöglicht für die Zygotenbehandlung mit Mutagenen in einem definierten Meiosestadium eine bequeme und routinemäßig durchführbare Handhabung unter konstanten Bedingungen. Dazu wurde erstmals ein Sechsfach - Hydrosolständer der Firma Millipore (Kata-

log - Nr. (1983): XX 25 04700) eingesetzt. Dieser Vakuumständer aus Edelstahl hat sechs Saugstutzen, auf denen je ein Glasaufsatz befestigt werden kann, und ist an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Auf die Glasaufsätze, die eine teflonisierte Randoberfläche haben, werden die Milliporefilter mit einer Porengröße von 3 μ m Durchmesser gelegt. Es handelt sich um weiße Polyacetatfilter mit einem Durchmesser von 47 mm.

Auf diesen Filtern wird nach entsprechender Verdünnung der Zygotensuspension jeweils eine konstante Zahl von etwa 100 Zygoten gleichmäßig verteilt. Pro Behandlungskonzentration bzw. Kontrolle werden jeweils Serien von sechs bzw. zwölf Filtern angelegt, so daß pro Serie in einem Experiment 600 bzw. 1200 Zygoten ausgewertet werden können.

2.3.8. Behandlung

2.3.8.1. Behandlungszeitpunkt

Nach Vorversuchen erwies es sich als günstig, den Behandlungszeitpunkt in Anlehnung an die Ergebnisse von Davies und Lawrence (1967) und Lawrence und Davies (1967) auf die 6. Stunde nach Meioseinduktion festzulegen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Zygotenwand wieder dünnwandiger und durchlässiger geworden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die applizierten Mutagene in die Zygoten eindringen können. Die Behandlung erfolgt damit vor der Hauptreplikationsphase der DNA (Chiu und Hastings 1973).

2.3.8.2. Behandlungsmodus

Für die Behandlung der Zygoten wurde in dieser Arbeit die Methode von Lawrence und Davies (1967) in abgewandelter Form verwendet, die es ermöglicht, daß die Synchronität während der Reduktionsteilung nicht beeinflußt wird. Dazu wird pro Milliporefilter eine Petrischale mit einer doppelten Lage Papierrundfiltern (Fa. Schleicher & Schüll, Nr. 33 1607, Ø 55 mm) vorbereitet. Diese Papierfilter werden jeweils mit 1 ml der wäßrigen Behandlungslösung unmittelbar vor der Behandlung getränkt. 6 Stunden nach Meioseinduktion werden die Milliporefilter mit den Zygoten durch ein leichtes Vakuum auf dem Hydrosolständer getrocknet und anschließend auf die Papierfilter mit der Behandlungslösung gelegt. Diese saugt sich in die Milliporefilter und wird so den Zygoten zugeführt.

Während der Einwirkungszeit werden die Zygoten unter Lichtabschluß gehalten. Das Ende der Behandlung wird durch das Absaugen der Behandlungslösung auf dem Vakuumständer gesetzt. Anschließend werden die Milliporefilter zwei Mal mit verdünnter Pufferlösung (P 1+2) gewaschen und auf das ursprüngliche Festmedium zurückgelegt. Auf diesem werden sie im Dauerlicht (Weißlicht, ca. 5000 Lux Beleuchtungsstärke) für 6 Tage bei 298 K gehalten.

Neben den behandelten Serien wird pro Versuch eine Kontrollserie mitgeführt, die ständig im Dauerlicht bleibt. Blindversuche zeigten, daß die Rekombinationsrate durch eine Behandlung mit Aqua dest. bzw. verdünnter Pufferlösung (P 1+2) nicht beeinflußt wird.

2.3.9. Auswertung

Nach 6 Tagen sind die Zygoten auf den Milliporefiltern zu sichtbaren Kolonien herangewachsen. Die Zygotenkolonien bestehen aus den vegetativen Nachkommen der Tochterzellen. Je nach Crossing - over - Häufigkeit zwischen den homologen Chromosomen während der Meiose kann der Anteil an Wildtypzellen in den Zygotenkolonien gemäß dem Schema der Segregation von gekoppelten Genen (Abb.3, S. 9) variieren. So enthalten die Kolonien vom Parental - Dityp keine Wildtypzellen. Sie können im Gegensatz zu den Kolonien vom Nonparental - Dityp und Tetratyp nicht auf Minimalmedium wachsen.

Um das Nährstoffbedürfnis der Kolonien zu prüfen, werden sie auf Minimalmedium überführt. Mit Hilfe eines Samtstempels, über den jeweils ein Papierrundfilter (Fa. Macherey & Nagel, Papierfilter für quantitative Analysen, MN 16, Ø 15 cm) gespannt ist, wird das Koloniemuster von dem Argininmedium auf das Minimalmedium übertragen.

Nach weiteren 5 Tagen, in denen die Zygotenkolonien, die Wildtypzellen enthalten, auf dem Minimalmedium im Dauerlicht unter Standardbedingungen zu sichtbaren Kolonien herangewachsen sind, werden die Kolonien auf dem Arginin- und Minimalmedium ausgezählt. Aus den dabei erhaltenen Werten wird die Rekombinationsrate (RR) ermittelt:

$$RR = \frac{\text{Koloniezahl auf Minimalmedium}}{\text{Koloniezahl auf Argininmedium}} \times 100$$

Bezogen auf die Rekombinationsrate der Kontrollserie er-

gibt sich daraus die relative Rekombinationsrate:

$$\text{rel. RR} = \frac{\text{RR behandelte Serie}}{\text{RR Kontrollserie}} \times 100$$

Gleichzeitig kann die Überlebensrate bestimmt werden. Als überlebende Zygoten werden solche definiert, die nach der Behandlung noch in der Lage sind, auf dem Argininmedium Kolonien zu bilden. Vergleicht man die Koloniebildungsfähigkeit nach der Behandlung mit einer bestimmten Substanzkonzentration mit der der Kontrollserie, so ergibt sich die relative Überlebensrate:

$$\text{rel. UR} = \frac{\text{Zygotenkoloniezahl nach Behandlung}}{\text{Zygotenkoloniezahl ohne Behandlung}} \times 100$$

In die Arbeit wurden die Ergebnisse der Versuche mit einbezogen, die in einem Konfidenzintervall mit der Konfidenzzahl $\gamma = 95\%$ liegen (Kreyszig 1975).

Mit dem χ^2 -Test wurde überprüft, inwieweit die gemessenen Effekte signifikante Abweichungen von der Rekombinationsrate der Kontrolle darstellen. Bei einem Freiheitsgrad von 1 und einer Signifikanzzahl von $\alpha = 5\%$ ist $c = 3,84$.

In den Tabellen sind alle Werte gekennzeichnet, die eine signifikante Erhöhung der Rekombinationsrate darstellen ($\chi^2 > c$).

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt entsprechend der in der Mutagenitätsprüfung üblichen Form. Die Werte für die relative Rekombinations- bzw. relative Überlebensrate werden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Die Meßpunkte sind jeweils Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.

3. Wahl und Anwendungsbedingungen der Testsubstanzen

Dem zweiten Teil dieser Arbeit liegt die Fragestellung zugrunde, ob in dem beschriebenen Testsystem quantitative, dosisabhängige Effekte chemischer Substanzen nachgewiesen werden können. Hierzu wurde eine Anzahl bekannter Mutagene auf ihren Einfluß auf die meiotische Rekombination hin geprüft.

Alkylierende Agentien sind auf ihren Reaktionsmechanismus und dessen Korrelation mit biologischen Effekten hin gut untersucht (Turtoczky und Ehrenberg 1970; Lawley 1974; Vogel und Natarajan 1982). Obwohl die genetischen Effekte der Alkylantien in einzelnen Systemen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Testorganismus und den jeweiligen speziellen Anwendungsbedingungen variieren, sind Gesetzmäßigkeiten für die biologische Aktivität alkylierender Substanzen gefunden worden, die allgemein Gültigkeit haben. Um die Qualität und Leistung des entwickelten Testsystems beurteilen zu können, wurde mit dem schwerpunktmäßigen Einsatz der Alkylantien geprüft, ob sich diese Gesetzmäßigkeiten in den gemessenen Effekten wiederfinden lassen.

Alkylierende Agentien sind in vegetativen Kulturen von *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgreich als Mutagene eingesetzt worden (Gillham 1965; Loppes 1966, 1968, 1969 a; Schimmer und Loppes 1975; Hawks und Lee 1976). Darüber hinaus fanden Zimmermann et al. (1966), Zimmermann (1971) und Fahrig (1979, 1982) einen Einfluß dieser Substanzen auf die mitotische Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae*.

Um daneben auch die Effekte von Substanzen, die über an-

dere Mechanismen und Reaktionen mit der DNA wirksam sind, zu prüfen, wurden darüber hinaus NaNO_2 , dessen mutagene Wirkung in *Chlamydomonas reinhardtii* (Tschäpe 1966) und dessen rekombinogene Wirkung in *Saccharomyces cerevisiae* (Fahrig 1982) bekannt ist, sowie die radikalbildenden Substanzen H_2O_2 und Azobisisobutyronitril eingesetzt.

Tabelle 1 : Ausgewählte Testsubstanzen

Substanzklasse	Testsubstanz
<u>Alkylierende Agentien</u> <u>Nitrosoverbindungen:</u> Nitrosamide Nitrosamine <u>Alkylalkansulfonate:</u> Alkylmethansulfonate <u>Cyclische Alkylantien:</u> Stickstofflost - Verbindungen	 $\text{MNNG}^{1)}$, $\text{ENU}^{2)}$ $\text{DMN}^{3)}$ $\text{MMS}^{4)}$, $\text{EMS}^{2)}$ $\text{CPA}^{4)}$
<u>Nicht - alkylierende Agentien</u> <u>Desaminierende Substanzen</u> <u>Radikalbildende Substanzen</u>	 $\text{NaNO}_2^{5)}$ (HNO_2) $\text{H}_2\text{O}_2^{3)}$ Azobisisobutyronitril ⁵⁾

¹⁾Serva Feinbiochemica, Heidelberg; ²⁾Sigma Chemie, Taufkirchen; ³⁾Ega Chemie, Steinheim; ⁴⁾Aldrich Chemie, Steinheim; ⁵⁾Merck, Darmstadt

3.1. Alkylierende Agentien

Von ihrer chemischen Struktur her ist die Substanzgruppe der alkylierenden Agentien heterogen. Zusammengefaßt werden sie aufgrund eines gemeinsamen Alkylierungsmechanismus durch nukleophile Substitution. Von den biologischen Effekten dieser Substanzen interessieren hier insbesondere die genotoxischen, die aus der Alkylierung von DNA und Proteinen resultieren.

3.1.1. Nitrosoverbindungen

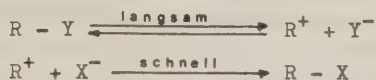
Man unterscheidet innerhalb der Nitrosoverbindungen die Nitrosamide und die Nitrosamine.

3.1.1.1. Nitrosamide

Bei den Nitrosamiden handelt es sich um photosensitive Substanzen. Da ihre Stabilität von pH und Temperatur abhängt, beeinflussen diese beiden Faktoren auch ihre biologische Aktivität (Neale 1972; Guttenplan und Milstein 1982), so daß Neale (1976) für ihren Einsatz in genetischen Tests absolute Dunkelheit und definierte pH- und Temperaturbedingungen fordert. In wäßriger Lösung zerfallen die Nitrosamide spontan zu relativ stabilen, positiv geladenen Carboniumionen. Diese können mit nukleophilen Substanzen reagieren. Die Alkylierungsreaktion



setzt sich aus zwei Teilreaktionen zusammen:

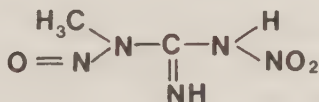


($\text{R} - \text{Y}$ = Alkylans, R^+ = Carboniumion, $\text{R} - \text{X}$ = alkylierte Verbindung, Y^- = Rest, X^- = Nukleophil)

In einem langsamen Schritt wird das elektrophile Carboniumion gebildet, das in einer zweiten schnellen Reaktion mit dem Nukleophil reagiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der gesamten nukleophilen Substitution ist somit von der langsamsten Teilreaktion und daher nur von der Konzentration des Elektrophils abhängig. Sie verläuft nach einer unimolekularen Kinetik ($\text{S}_{\text{N}}1$ - Mechanismus) (Lawley 1974).

Nitrosamide sind somit direkt wirksame Alkylantien. In diesem Testsystem wurden von ihnen die Substanzen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und Ethylnitrosoharnstoff (ENU), beides monofunktionelle Alkylantien, auf ihre rekombinogene Wirkung in *Chlamydomonas reinhardtii* hin untersucht.

3.1.1.1.1. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)



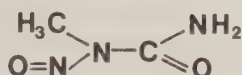
Seit Mandell und Greenberg (1960) die genotoxische Aktivität von MNNG erkannten, ist diese Substanz in einer Viel-

zahl von Testsystemen und - organismen auf ihre mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften hin geprüft worden (Gichner und Veleminsky 1982). Auch in *Chlamydomonas reinhardtii* ist MNNG als Mutagen in vegetativen Kulturen eingesetzt worden (Schimmer und Loppes 1975; Gichner und Veleminsky 1982). Über die Wirkung von MNNG in meiotischen Systemen ist wenig bekannt. Nachdem MNNG im mitotischen Zyklus von *Saccharomyces cerevisiae* Mutationen, mitotisches Crossing - over und mitotische Genkonversion auslöst (Zimmermann 1966; Fahrig 1979, 1982; Gichner und Veleminsky 1982), setzten Kelly et al. (1983) es auch im meiotischen Zyklus von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm D7) ein. Sie konnten aber keinen signifikanten dosisabhängigen Effekt auf die Mutations- und Genkonversionsrate feststellen. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde der Einfluß von MNNG auf die meiotische Rekombination bislang nicht untersucht.

Nach Angaben von Cerdá-Clmedo und Hanswalt (1967) hat MNNG bei pH 5 die größte Stabilität. Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit für MNNG (pH 7, T = 298 K, absoluter Lichtabschluß) kann davon ausgegangen werden, daß die Substanz spontan zerfällt. Dabei entsteht das wiederum sehr instabile Diazoniumion CH_3N_2^+ . Dieses zerfällt in Stickstoff (N_2) und das elektrophile Methylkation (CH_3^+), das mit nukleophilen Zentren in Nukleinsäuren und Proteinen reagieren kann (Kriek und Emmelet 1964; Lawley 1968; Sugimura 1968). Diese Reaktion ist verantwortlich für die biologische Aktivität von MNNG (Lawley 1974; Ostermann-Golkar 1974) bei pH 5. Darüber hinaus können Proteine im Gegensatz zu den DNA - Molekülen auch nitroamidiert werden (Gichner und Veleminsky 1982).

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde MNNG am Vortag des jeweiligen Versuchs in Aqua dest. gelöst und die Stammlösung eingefroren. Unmittelbar vor der Behandlung wurde sie aufgetaut und auf die Konzentration der Behandlungslösung verdünnt. Dieser Vorgang dauerte jeweils ca. 5 Minuten, die anschließende Behandlung 30 Minuten.

3.1.1.1.2. Ethylnitrosoharnstoff (ENU)



ENU ist ebenfalls sehr instabil und zerfällt bei physiologischem pH spontan unter Bildung des reaktiven Ethylnitrosations. De Kok et al. (1983) untersuchten den Einfluß von Temperatur und pH auf die biologische Aktivität und Stabilität von ENU - Lösungen. Sie geben für verschiedene Temperaturen (bei konstantem pH von 7,25) und verschiedene pH - Werte (bei konstanter Temperatur von 298 K) folgende Halbwertszeiten für ENU an:

T [K]	t 1/2 [min]	pH	t 1/2 [min]
318	3	6	280
308	7	8	7
298	38		

Das für die Experimente in dieser Arbeit verwendete ENU ist zu 20 % Gewichtsanteilen mit Essigsäure (CH_3COOH) als Stabilisator versetzt, die den spontanen Zerfall hemmt.

ENU ist auf seine Mutagenität und Kanzerogenität hin gut untersucht (Vogel und Natarajan 1979; Theiß et al. 1983), die auf der genotoxischen Aktivität des reaktiven Ethylkations beruhen. Publikationen über die Wirkung von ENU in *Chlamydomonas reinhardtii* liegen allerdings bislang nicht vor.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde ENU kurz vor der Behandlung in Aceton p.a. gelöst und anschließend in die wäßrige Behandlungslösung der jeweiligen Behandlungskonzentration überführt, was zwischen 3 und 5 Minuten dauerte. Wie bei MNNG wurden die Experimente unter Lichtabschluß bei pH 7 und 298 K durchgeführt. Auch hier betrug die Behandlungszeit 30 Minuten.

3.1.1.1.3. Kombinationsversuche von ENU und Coffein

Zusätzliche Versuche wurden mit ENU als Modellsubstanz durchgeführt, um die Wirkung der kombinierten Behandlung der Zygoten mit ENU und Coffein⁺) zu untersuchen.

Coffein, 1,3,7-Trimethylxanthin, ist ein Purinderivat, das Komplexe mit Nukleinsäuren eingehen kann (Lieb 1961) und sowohl mutagen wirkt als auch Repairprozesse in Mikroorganismen und Säugern beeinflussen kann (Adler 1970). Auch in *Chlamydomonas reinhardtii* konnten modifizierende Effekte in vegetativen Kulturen und Zygoten auf Reparatursysteme gefunden werden (Portney und Rosen 1980; Rosen et al. 1980; Robisch 1981). Nach den Untersuchungen von Rosen und Ebersold (1972) gibt es in *Chlamydomonas reinhardtii* einen Rekombinationsrepair. Dieser wird durch drei Enzymsysteme gesteuert. Eines dieser Enzymsysteme spielt

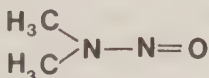
⁺)bezogen von der Fa. Carl Roth, Karlsruhe

auch bei den Prozessen der meiotischen Rekombination eine Rolle. Seine Aktivität kann bei UV - Behandlung durch Coffein modifiziert werden (Portney und Rosen 1980). In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob Coffein auch einen Einfluß auf den rekombinogenen Effekt von ENU hat.

Dazu wurden die Behandlungslösungen von drei ausgewählten ENU - Konzentrationen parallel mit Coffein in einer Konzentration von 1,5 mg/ml versetzt, nachdem geprüft worden war, daß diese Konzentration keinen Einfluß auf die spontane Rekombinationsrate hat sowie nicht toxisch wirkt. Dabei ist bemerkenswert, daß die repairmodifizierende Wirkung von Coffein auch in anderen Systemen erst bei relativ hohen Konzentrationen erfolgt (Putrament 1972).

3.1.1.2. Nitrosamine

3.1.1.2.1. Dimethylnitrosamin (DMN)



Im Gegensatz zu den instabilen Nitrosamiden handelt es sich bei den Nitrosaminen, und so auch bei DMN, um stabile Substanzen, die durch metabolische Aktivierungssysteme zu biologisch wirksamen Produkten abgebaut werden müssen, welche die mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften dieser Substanzen bewirken (Malling 1966; Druckerey et al. 1967; Prival et al. 1979). Für die Bildung akti-

ver Metaboliten von DMN ist zunächst eine Dealkylierung notwendig. Diese kann von den Organismen mikrobieller Testsysteme nicht durchgeführt werden. *Drosophila*, höhere Pflanzen sowie Säugerzellen verfügen dagegen über Enzyme, durch die DMN dealkyliert und damit aktiviert werden kann. So konnte in Säugern (Craddock und Magee 1963) und Säugerzellkulturen (Langenbach et al. 1981; Mendoza-Figuera et al. 1983), in *Arabidopsis thaliana* (Veleminsky und Gichner 1968), *Tradescantia* (Gichner et al. 1980, 1982), *Glycine max* (Arenaz 1978 a, b), *Vicia faba* (Kihlmann 1961) und *Hordeum vulgare* (Sutzhil und Kaul 1973) sowie *Drosophila melanogaster* (Pasternak 1962; Graf et al. 1984) biologische Aktivität von DMN nachgewiesen werden.

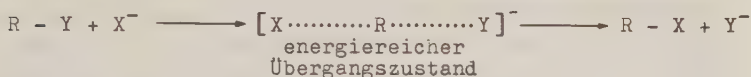
Für mikrobielle Testorganismen kann die Metabolisierung durch enzymatische Aktivierung wie im Host - mediated - Assay (Fahrig 1973 a, b; Malling 1974) bzw. mikrosomale Enzyme (Malling 1974) oder durch ein enzymfreies Hydroxylierungsmedium nach Udenfriend (Preussmann 1964; Malling 1966; Mayer 1971, 1973) *in vitro* erfolgen.

Auf seine rekombinogenen Eigenschaften hin wurde DMN im mitotischen Zyklus von *Saccharomyces cerevisiae* (Mayer 1973) untersucht. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde DMN bislang nicht auf seine genotoxische Aktivität geprüft.

Die Stammlösungen für die Experimente dieser Arbeit wurden mit DMSO vor jedem Versuch hergestellt und diese vor der Behandlung auf die gepufferten wäßrigen Lösungen (pH 7) verdünnt. Eine Metabolisierung der Substanz durch eines der oben genannten Aktivierungssysteme erfolgte nicht.

3.1.2. Alkylalkansulfonate

Alkylalkansulfonate sind stabile Substanzen, die nukleophile Zentren im Gegensatz zu den Nitrosamiden als neutrale Moleküle angreifen.

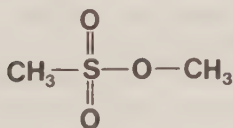


(R - Y = Alkylans, R - X = alkylierte Verbindung, X⁻ = Nukleophil, Y⁻ = Rest)

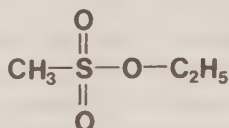
Die Reaktion erfolgt über einen energiereichen Übergangszustand. Die Geschwindigkeit der Alkylierungsreaktion ist so von der Konzentration beider Reaktionspartner abhängig und verläuft nach einer Kinetik zweiter Ordnung (S_N² - Mechanismus) (Kaufmann 1974).

3.1.2.1. Alkylmethansulfonate

Von den Alkylmethansulfonaten wurden Methylmethansulfonat (MMS) und Ethylmethansulfonat (EMS) ausgewählt, um ihre rekombinogene Aktivität im generativen Zyklus von Chlamydomonas reinhardtii zu bestimmen.



MMS



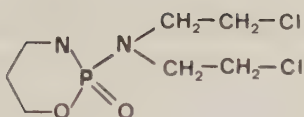
EMS

Diese beiden direkt wirksamen, monofunktionellen Alkylantien sind bekannte Mutagene. Auch in *Chlamydomonas reinhardtii* wurden sie auf ihre Mutationsinduktion hin untersucht (Loppes 1966, 1968; Ranneberg und Arnold 1968; Loppes 1969 a; Hawks und Lee 1976; Sweet et al. 1981). Während MMS ein gutes, aber unspezifisches Mutagen für *Chlamydomonas reinhardtii* ist, sind die Angaben für EMS in der Literatur widersprüchlich. Ranneberg und Arnold (1968) beobachteten geringe mutagene, aber starke toxische Effekte, die von Loppes (1968) durch gegenteilige Ergebnisse widerlegt wurden.

Für die Experimente dieser Arbeit wurden MMS- und EMS - Stammlösungen mit DMSO hergestellt. Die wäßrige Behandlungslösung wurde auf pH 7 gepuffert. Während alle anderen getesteten Alkylantien 30 Minuten appliziert wurden, dauerte die Behandlung mit MMS und EMS 60 Minuten, da bei einer kürzeren Behandlungszeit keine signifikanten Effekte auf die Rekombinationsrate zu beobachten waren. Auch hier erfolgte die Behandlung unter absolutem Lichtabschluß bei 298 K.

3.1.3. Cyclische alkylierende Verbindungen

Von ihrer chemischen Struktur her sind die cyclischen Alkylantien sehr heterogen. Zusammengefaßt werden sie aufgrund ihrer Fähigkeit, nukleophile Substanzen zu alkylieren. In diese Gruppe gehört auch Cyclophosphamid (N,N-bis(2-chlorethyl)-N,O-propylenphosphorsäurediamid). Cyclophosphamid, eine Stickstofflost - Verbindung, ist ein bifunktionelles alkylierendes Agens, das in der Krebstherapie als Zytostatikum angewendet wird (Mutschler 1981).



Cyclophosphamid vermag neben Monoalkylierungen von Nukleinsäuren, die seine Mutagenität und Kanzerogenität bewirken, Crosslinks in der DNA zu bilden, auf die seine zytostatischen Eigenschaften zurückzuführen sind. Der therapeutischen Verwendung sind jedoch insofern Grenzen gesetzt, als neben den Tumorzellen auch normale Zellen angegriffen werden und Cyclophosphamid so im Bereich wirksamer Dosen auch zytotoxische Effekte zeigt.

Cyclophosphamid ist in Bakterien (Gatehouse 1978), Hefen (Fleer et al. 1982) und anderen Pilzen (Kokontis und Garber 1983) nur schwach wirksam. Erst die Metabolisierung der Substanz führt zu der Bildung von Abbauprodukten, die eine größere biologische Aktivität haben. Die Metabolisierung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, wobei je nach Methode unterschiedliche Abbauprodukte gebildet werden:

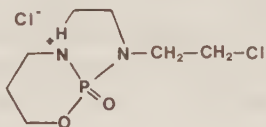
- a) durch mikrosomale Enzyme (Leberhomogenat (Ellenberger und Mohn 1975), Host - mediated - Assay (Hales 1982)),
- b) durch enzymfreie in vitro - Hydrolysierung mit einem modifizierten Udenfriend - Medium (Madle und Obe 1980),
- c) durch Hydrolyse unter Erwärmung (Mayer et al. 1976).

In mikrobiellen Testsystemen wurde Cyclophosphamid in *Escherichia coli* (Ellenberger und Mohn 1975; Hales 1982),

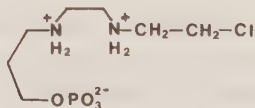
Salmonella typhimurium (Ellenberger und Mohn 1975) und *Saccharomyces cerevisiae* (Mayer et al. 1976) auf seine Mutagenität und in sich mitotisch teilenden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* (Fahrig 1973 a) und *Ustilago violaceae* (Kokontis und Garber 1983) auf seine Rekombinogenität hin getestet.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurde Cyclophosphamid nach der von Mayer et al. (1976) publizierten Methode durch Hydrolyse abgebaut. Die Stammlösungen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO angesetzt. Jeweils parallele Serien der wässrigen Behandlungslösungen wurden 6 Stunden vor der Behandlung der Zygoten bei 296 K und 303 K vorinkubiert. Anschließend wurden die Zygoten für 30 Minuten bei 298 K behandelt.

Nach Fleer et al. (1982) entsteht unter diesen Bedingungen zunächst ein bicyclisches Zwischenprodukt, das sehr labil ist,



und bei weiterer Hydrolyse in das monofunktionelle N-(2-chloroethyl)-N'-(3-phosphatopropyl)ethylendiammonium übergeht:



Dieses bewirkt die alkylierende Aktivität von Cyclophosphamid unter den Hydrolysebedingungen der Experimente dieser Arbeit.

3.2. Nicht - alkylierende Verbindungen

Als weitere Testsubstanzen wurden Verbindungen auf ihre rekombinogenen Eigenschaften hin untersucht, deren Reaktion mit zellulären Molekülen, und hier wieder speziell Nukleinsäuren und Proteinen, nicht zu einer Alkylierung führt. Eingesetzt wurden Natriumnitrit sowie die radikalbildenden Substanzen H_2O_2 und Azobisisobutyronitril.

3.2.1. Natriumnitrit

Natriumnitrit, NaNO_2 , hydrolysiert in wäßriger Lösung unter Bildung von salpetriger Säure:



(Hydrolysekonstante $K_{\text{H}} = 3,96 \cdot 10^{-13}$)

Salpetrige Säure ist ein klassisches Mutagen, das Nukleinsäuren durch oxidative Desaminierung verändert (Cytosin $\rightarrow$ Uracil, Adenin $\rightarrow$ Hypoxanthin, Guanin $\rightarrow$ Xanthin) (Singer und Kusmierek 1982). Darüber hinaus bedingt es Crosslink - Bildungen in der DNA durch direkte Kopplung zweier Nukleinsäuren. Es konnten Diguanyl- sowie Guanyladenin - Crosslinks nachgewiesen werden (Singer und Kusmierek 1982).

Infolge der pH - Abhängigkeit der Hydrolyse von Natriumnitrit ist auch die Genotoxizität dieser Substanz pH - abhängig.

Tschäpe (1966) setzte NaNO_2 erfolgreich in *Chlamydomonas*

reinhardii als Mutagen ein. Rekombinogene Eigenschaften dieser Substanz wurden in *Saccharomyces cerevisiae* von Zimmermann et al. (1966) und Fahrig (1982) untersucht. Hier konnten Effekte auf die mitotische Rekombination nachgewiesen werden, während über die Wirkung in meiotischen Systemen nichts bekannt ist.

Während die oben genannten Autoren mit NaNO_2 bei pH 4 arbeiteten, wurden die Behandlungslösungen für die Experimente dieser Arbeit auf pH 7 mit Phosphatpuffer gepuffert. Die Stammlösungen wurden mit Aqua dest. hergestellt. Auch hier wurde die Behandlung unter Lichtabschluß durchgeführt, die Behandlungsdauer betrug 30 Minuten.

3.2.2. Radikalbildende Substanzen

Die große Reaktivität der radikalbildenden Substanzen bedingt, daß sie unspezifisch mit den Molekülen zellulärer Strukturen und so auch mit den Nukleinsäuren reagieren. Von den Radikalen ist bekannt, daß sie die Primärstruktur der DNA drastisch verändern (Rhaese und Freese 1968). Prinzipiell kann dieses durch folgende Effekte bedingt sein (Freese 1971):

1. Abbau der Zucker - Phosphat - Bindung
2. Oxidation der Zuckermoleküle
3. Abbau der Zucker - Basen - Bindung
4. Oxidation und Abbau der Basen

In dieser Arbeit wurden die beiden radikalbildenden Substanzen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Azobisisobutyronitril eingesetzt.

3.2.2.1. Wasserstoffperoxid

Peroxide wie H_2O_2 produzieren $\text{OH}^\cdot$ - Radikale unter Spaltung der Bindungsenergie des Moleküls. Diese beträgt für H_2O_2 217,4 kJ/Mol bei 298 K (Organikum 1973). Die Spaltung kann durch energiereiche und ionisierende Strahlung, Redoxprozesse oder Temperaturerhöhung erfolgen. So wurde H_2O_2 in der vorliegenden Arbeit mit FeSO_4 in unterschiedlicher Konzentration verwendet, das den Zerfall von H_2O_2 katalysiert. Dabei läuft folgende Reaktion ab:



3.2.2.2. Azobisisobutyronitril

Azobisisobutyronitril ist eine sehr instabile Substanz (Bindungsenergie: 154,7 kJ/Mol bei 298 K (Organikum 1973)). Sie zerfällt spontan unter Bildung von Radikalen:



Für die allgemeine Mutagenitätsprüfung wurde diese Substanz bislang nicht verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde sie als Vergleichssubstanz eingesetzt, um zu prüfen, ob sich hier ähnliche Effekte zeigen wie bei der Anwendung von H_2O_2 .

Beide Substanzen wurden in wäßriger Lösung angewendet. Die Behandlungsdauer betrug 15 Minuten, da bei einer längeren Anwendungszeit zu starke toxische Effekte zu beobachten waren, die eine Auswertung unmöglich machten.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluß von MNNG und ENU auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate

Entsprechend der Tatsache, daß die Kinetik der Alkylierung durch die beiden Nitrosoverbindungen MNNG und ENU nach einer nukleophilen Substitution 1. Ordnung verläuft, zeigen diese beiden Substanzen auch in dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem Effekte, die sich mit der Reaktionskinetik übereinstimmend korrelieren lassen. In den Abbildungen 4 a (S. 44) und 5 a (S. 46) ist der Einfluß von MNNG und ENU auf die relative Überlebensrate der Zygoten dargestellt. Beide Kurven haben einen geschulterten Verlauf. In einem niedrigen Konzentrationsbereich wird die relative Überlebensrate zunächst nur gering beeinflusst, die Kurve fällt flach ab. Bei weiterer Erhöhung der Dosis wird die Steigung steiler, und die Überlebenden nehmen linear ab.

MNNG wirkt allerdings schon bei einer geringeren molaren Konzentration toxisch als ENU. Das hat für die Messung der Rekombinationsrate zur Folge, daß diese für MNNG nur in einem engen Konzentrationsbereich von 6,8 - 68,0 μM und verglichen mit ENU in niedrigeren Konzentrationen ermittelt werden kann. Diesen deutlichen Unterschied zwischen MNNG und ENU zeigt eine Gegenüberstellung der UR_{80} - und UR_{50} - Werte, die angeben, welche Konzentration der jeweiligen Substanz zu einer Erniedrigung der relativen Überlebensrate auf 80 % bzw. 50 % führt.

$$UR_x = \frac{\text{Konzentration der Substanz}}{x \% \text{ Überlebensrate}} \quad [\mu M]$$

Der UR_{80} - Wert kann für MNNG nicht angegeben werden, da diese Substanz bei allen getesteten Konzentrationen aufgrund ihrer großen Reaktivität toxischer wirkte. Dennoch wird er in die Tabelle mit aufgenommen, um die biologische Aktivität von ENU mit der von MMS und EMS vergleichen zu können.

	$UR_{80} \quad [\mu M]$	$UR_{50} \quad [\mu M]$
MNNG	/	0,9
ENU	8,6	59,2

Für beide Substanzen ist ein dosisabhängiger Einfluß auf die relative Rekombinationsrate zu beobachten (Abb. 4 b, S. 44 und Abb. 5 b, S. 46). Parallel zu dem Abfall für die relative Überlebensrate steigt die Rekombinationsrate unter dem Einfluß von MNNG bis auf einen Maximalwert von 144,0 % linear in einem Konzentrationsbereich von 6,8 - 68,0 μM an. Bemerkenswert ist, daß schon geringe Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Rekombinationsrate führen (vgl. auch Tab. 2, S. 45). Sobald allerdings die relative Überlebensrate unter einen Wert von 40 % sinkt, ist auch ein linearer Abfall in der Kurve für die relative Rekombinationsrate zu verzeichnen.

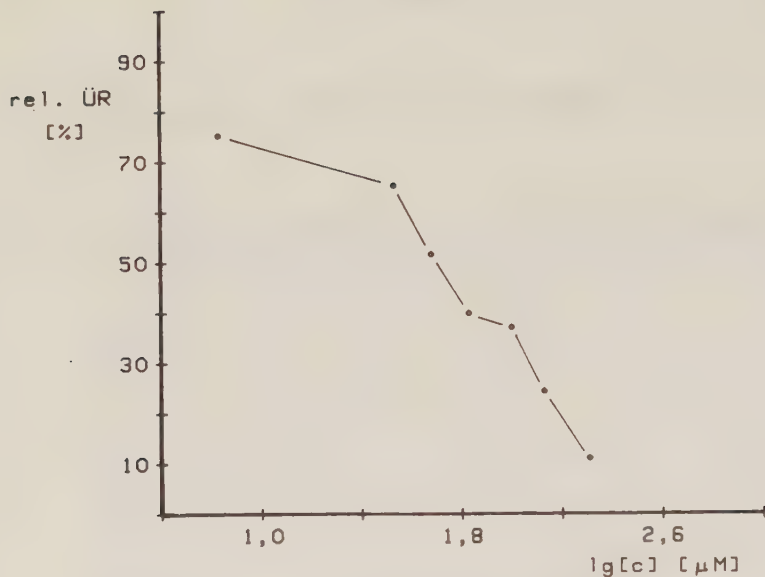


Abb. 4 a : Einfluß von MNNG auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

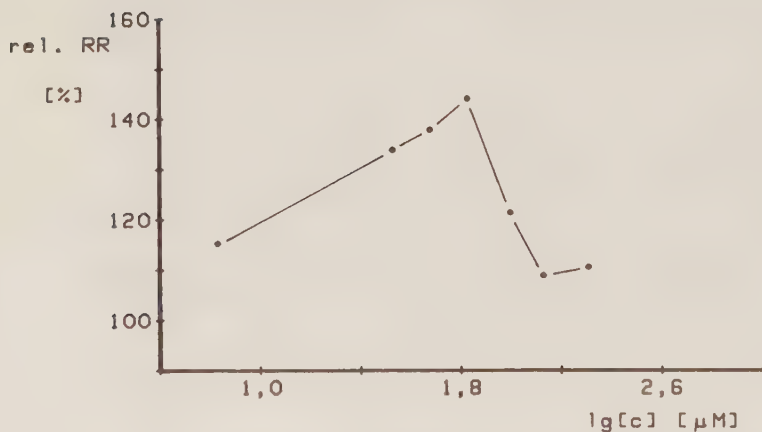


Abb. 4 b : Einfluß von MNNG auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

c [μ M]	rel. RR + SA	rel. ÜR + SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
6,8	115,3 $\pm$ 3,1*	75,2 $\pm$ 2,8	2352
34,0	133,8 $\pm$ 1,0*	65,2 $\pm$ 2,8	1994
48,0	137,8 $\pm$ 3,2*	51,5 $\pm$ 5,7	1608
68,0	144,0 $\pm$ 3,4*	39,8 $\pm$ 0,9	1227
102,0	121,3 $\pm$ 0,4*	37,0 $\pm$ 3,0	767
136,1	108,8 $\pm$ 8,5	24,3 $\pm$ 6,6	764
204,1	110,5 $\pm$ 12,0	11,0 $\pm$ 0,6	227

Tabelle 2 : Einfluß von MNNG auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

*statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

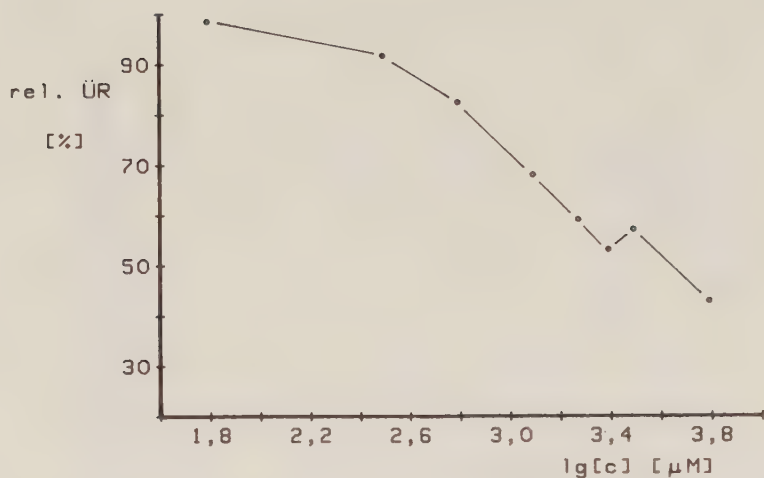


Abb. 5 a : Einfluß von ENU auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

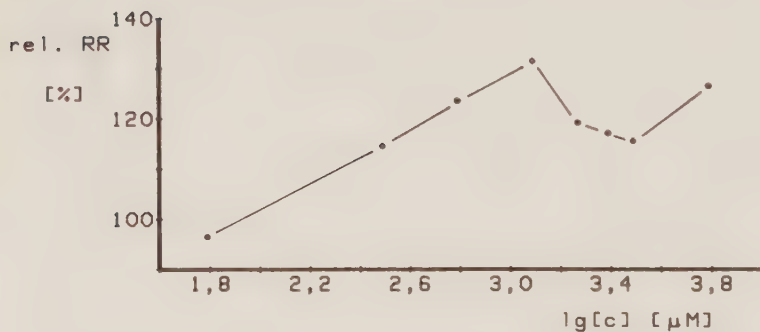


Abb. 5 b : Einfluß von ENU auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

c [μM]	rel. RR $\pm$ SA	rel. $\overline{\text{UR}}$ $\pm$ SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
62 ^{..}	96,5	98,5	1150
310	114,5 $\pm$ 2,9*	91,6 $\pm$ 1,9	4037
620	123,5 $\pm$ 3,4*	82,3 $\pm$ 2,7	4259
1240	131,4 $\pm$ 3,8*	67,9 $\pm$ 6,2	3567
1860	119,1 $\pm$ 1,9*	59,0 $\pm$ 3,1	1494
2480 ^{..}	117,0	53,0	1014
3100 ^{..}	115,4	57,0	897
6200 ^{..}	126,4	42,8	558

Tabelle 3 : Einfluß von ENU auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate
(wenn nicht anders angegeben, Mittelwerte aus mindestens vier Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate
.. es wurden nur zwei Versuche durchgeführt

Wie aus Tabelle 2 (S. 45) hervorgeht, ist die überlebende Zygotenzahl in diesem Konzentrationsbereich zu gering und die Streuung der Werte für die relative Rekombinationsrate zu groß, als daß sich hier noch dosisabhängige und statistisch gesicherte Effekte messen lassen können.

Ähnliches gilt für ENU. Auch hier ist ab einer bestimmten toxischen Konzentration (1860 μM) eine Grenze für die Messung der relativen Rekombinationsrate erreicht. Sobald hier die relative Überlebensrate unter 60 % sinkt, ist ein Abfall und Schwanken der Werte für die relative Rekombinationsrate zu verzeichnen (vgl. Tab. 3, S.47). Bei weniger toxischen Konzentrationen (62 - 1240 μM) ist dagegen, wie bei MNNG, ein linearer Anstieg der relativen Rekombinationsrate in Abhängigkeit von der ENU - Dosis allerdings mit einer geringeren Steigung bis auf 131,4 % zu beobachten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in diesem Testsystem gemessenen Effekte die Reaktionskinetik von MNNG und ENU gut wiedergeben. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der DNA - Alkylierung durch diese beiden Substanzen, die Bildung der elektrophilen Methyl- bzw. Ethylkationen, wird durch die Versuchsbedingungen begünstigt. MNNG und ENU liegen in der Behandlungslösung zu einem großen Teil in ionischer Form vor. Da diese Ionen reaktiv und klein sind, können sie gut in die Zygoten eindringen und dort nukleophile Zentren zellulärer Moleküle alkylieren. Ihre Reaktion mit der DNA wird in dem Testsystem in einem niedrigen Konzentrationsbereich als linearer Anstieg der relativen Rekombinationsrate gemessen. Die Alkylierung von Proteinen trägt zur Änderung der relativen Überlebensrate bei. Die dabei entstehenden Schäden sind für MNNG in einem Konzentrationsbereich von

6,8 - 34,0 μM , für ENU in einem Konzentrationsbereich von 62,0 - 310,0 μM noch tragbar. Bei höheren Konzentrationen summieren sich die Schäden jedoch, die relative Überlebensrate nimmt linear ab.

4.2. Einfluß von Coffein auf die dosisabhängigen Effekte von ENU

Durch die kombinierte Behandlung der Zygoten mit einer konstanten nicht - toxischen Coffeindosis (1,5 mg/ml) können die Effekte von ENU auf die relative Rekombinationsrate modifiziert werden. Bei allen drei getesteten ENU - Konzentrationen wird die relative Rekombinationsrate durch Coffein signifikant um eine jeweils ähnliche Zunahmerate erhöht. So verlaufen die beiden Kurven für die relative Rekombinationsrate unter dem Einfluß von ENU mit und ohne gleichzeitige Coffeinbehandlung fast parallel (Abb. 6 b, S. 50). Rosen et al. (1980) fanden bei Coffeingebe ebenfalls einen fördernden Einfluß auf die mit UV induzierte Rekombination in Zygoten.

Abbildung 6 a (S. 50) zeigt, daß bei der Behandlung der Zygoten mit niedrigen ENU - Konzentrationen (310 μM und 620 μM), die allein angewendet wenig toxisch wirken, kein signifikanter Einfluß durch Coffein beobachtet werden kann. Erst bei einer ENU - Konzentration von 1240 μM , die die Überlebensrate auf 67,9 % senkt, ist auch ein modifizierender Effekt auf die relative Überlebensrate durch Coffein zu beobachten. Der Wert für die relative Überlebensrate wird durch gleichzeitige Behandlung mit Coffein um fast 10 % auf 77,1 % angehoben.

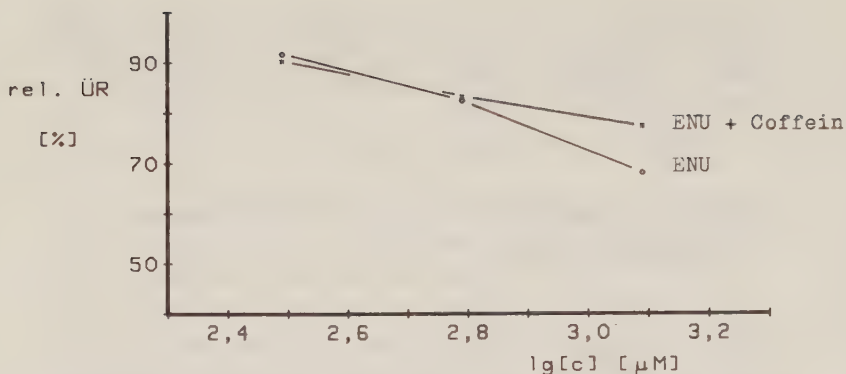


Abb. 6 a : Einfluß von ENU auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration mit und ohne gleichzeitige Coffein - Behandlung (1,5 mg/ml) (Behandlung: 30 min bei 298 K)

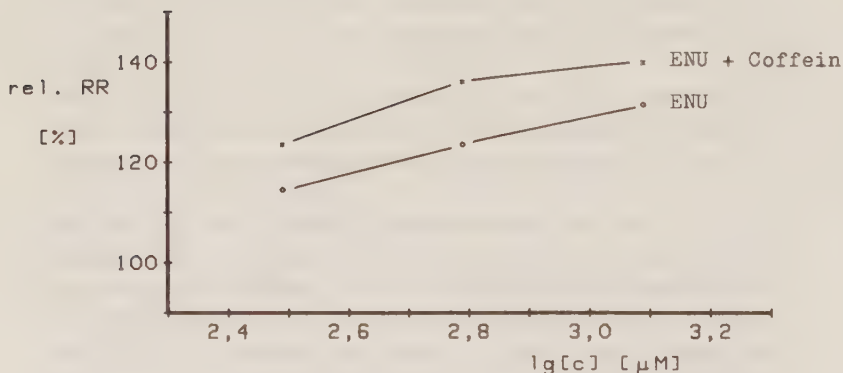


Abb. 6 b : Einfluß von Coffein (1,5 mg/ml) auf die rekombinogene Wirkung von ENU in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der ENU - Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

$c_{\text{ENU}} [\mu\text{M}]$	rel. RR + SA	rel. ÜR + SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
310	$123,5 \pm 1,0^*$	$90,2 \pm 0,8$	6633
620	$136,0 \pm 2,5^*$	$83,1 \pm 2,7$	6010
1240	$139,8 \pm 3,7^*$	$77,1 \pm 2,7$	5941

Tabelle 4 : Einfluß von ENU und Coffein (1,5 mg/ml) auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus vier Versuchen)

*statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

4.3. Einfluß von Dimethylnitrosamin auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate

In dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem können im Gegensatz zu anderen mikrobiellen Testsystemen und in Übereinstimmung mit Systemen, in denen höhere Pflanzen als Testorganismen dienen, Effekte von Dimethylnitrosamin ohne *in vitro* - Metabolisierung beobachtet werden. Diese Effekte unterscheiden sich jedoch deutlich von den Effekten, die mit den beiden Nitrosoverbindungen MNNG und ENU gemessen werden.

Die Kurve für die relative Rekombinationsrate steigt in Abhängigkeit von der DMN - Konzentration zwischen 14 und 680 μM zunächst steil an und erreicht bei weiterer Erhöhung der Konzentration bis auf 13500 μM einen Sättigungsbereich, der bei einer relativen Rekombinationsrate von ca. 150 % liegt (Abb. 7 b, S. 53). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in dem Meiosestadium, das für die Behandlung gewählt wurde, über Enzyme verfügen, die das stabile Dimethylnitrosamin zu genetisch aktiven Substanzen metabolisieren.

Der Einfluß von Dimethylnitrosamin auf die Überlebensrate der Zygoten ist dagegen vergleichsweise gering (Abb. 7 a, S. 53 ; Tab. 5, S. 54). Mit steigender DMN - Konzentration ist ein linearer Abfall der relativen Überlebensrate mit allerdings nur geringer Steigung zu verzeichnen, der sich über einen Konzentrationsbereich von 14 - 13500 μM erstreckt.

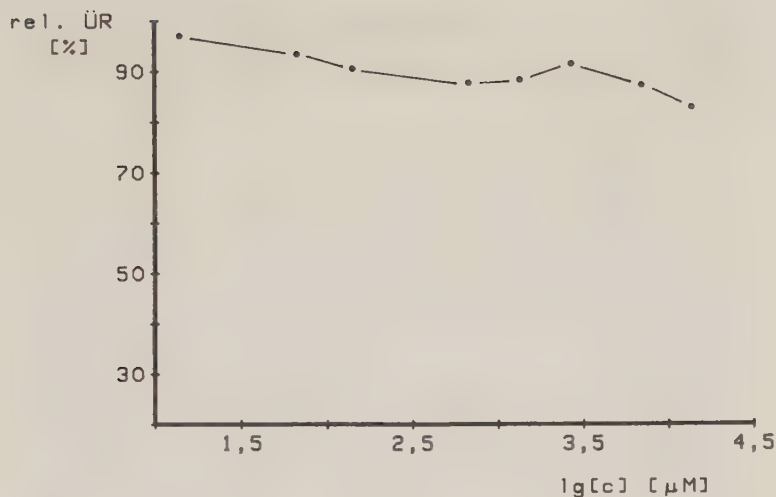


Abb. 7 a : Einfluß von DMN auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

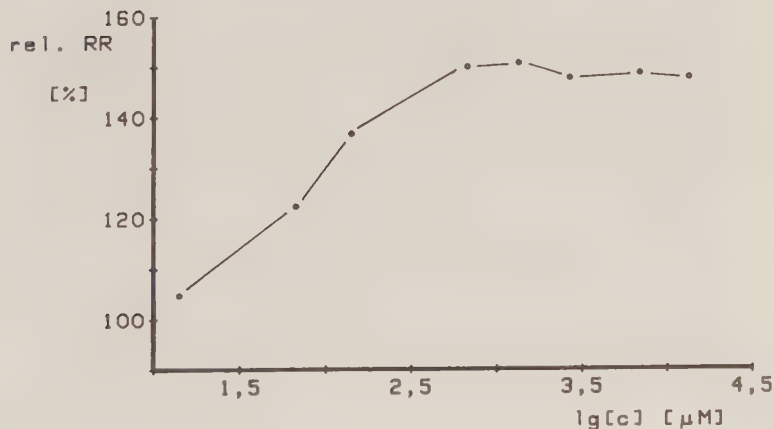


Abb. 7 b : Einfluß von DMN auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

c [μM]	rel. RP $\pm$ SA	rel. BR $\pm$ SA	Anzahl der un- terlebenden Zyg- oten
34	104,2 $\pm$ 5,2	37,0 $\pm$ 2,9	1270
68	122,4 $\pm$ 3,2*	33,5 $\pm$ 1,7	2422
140	136,3 $\pm$ 3,2*	30,7 $\pm$ 4,4	2654
280	150,1 $\pm$ 3,1*	28,0 $\pm$ 5,0	2228
560	150,3 $\pm$ 5,0*	28,6 $\pm$ 0,9	1974
1120	147,3 $\pm$ 3,5*	31,8 $\pm$ 0,3	1739
2240	143,9 $\pm$ 1,8*	27,6 $\pm$ 1,8	1412
4480	143,1 $\pm$ 5,5*	23,2 $\pm$ 1,5	1720

Tabelle 5 : Einfluß von DMN auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate
(Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

4.4. Einfluß von Methylmethansulfonat und Ethylmethan- sulfonat auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate

Die Effekte, die mit den beiden Alkylmethansulfonaten gemessen werden, spiegeln deren Reaktionskinetik, die sich aufgrund der Vorüberlegungen von der der Nitrosamide MNNG und ENU unterscheidet, wider. Ihr Einfluß ist dabei zunächst durch eine deutlich langsamere Reaktionsgeschwindigkeit gekennzeichnet. Um in dem Testsystem Effekte zu erzielen, müssen die Alkylmethansulfonate doppelt so lang wie die Nitrosoverbindungen, nämlich 60 Minuten, appliziert werden. Weitere Unterschiede zu MNNG und ENU ergeben sich aus dem deutlich anderen Kurvenverlauf, der für den Einfluß steigender Substanzkonzentration auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate gemessen wird (Abb. 4, S. 44, Abb. 5, S. 46 - Abb. 8, S. 56, Abb. 9, S. 58).

Die Abbildungen 8 (S. 56) und 9 (S. 58) zeigen, daß durch die Behandlung der Zygoten mit MMS und EMS ähnliche Effekte gemessen werden. Zunächst hat bei beiden Substanzen eine Erhöhung der Dosis in einem breiten Konzentrationsbereich, für MMS bis 590 μM und für EMS bis 28200 μM , keinen signifikanten Einfluß sowohl auf die relative Rekombinationsrate als auch auf die relative Überlebensrate. Diesem Kurvenabschnitt folgt bei der Messung der relativen Rekombinationsrate in Abhängigkeit von der Konzentration jeweils ein linearer Anstieg (Abb. 8 b, S. 56; Abb. 9 b, S. 58), der in der mit MMS gemessenen Kurve wieder leicht abflacht.

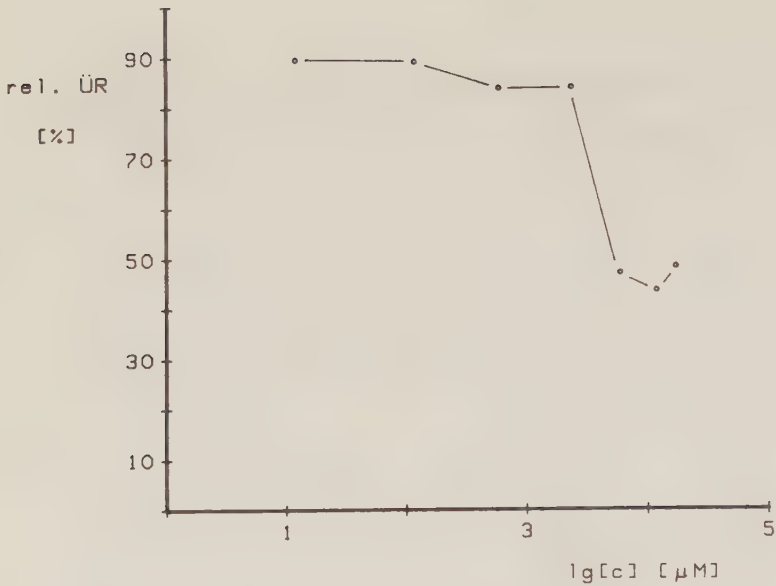


Abb. 8 a : Einfluß von MMS auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 60 min bei 298 K)

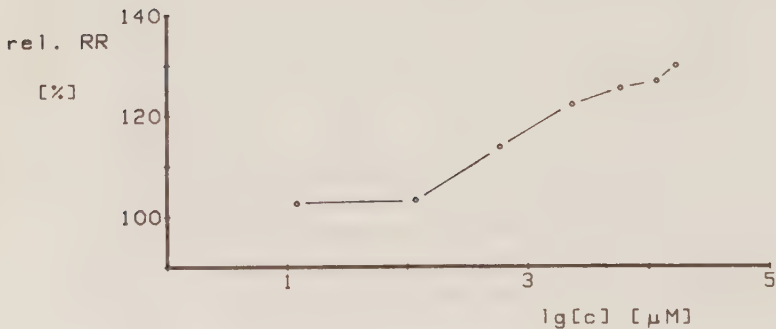


Abb. 8 b : Einfluß von MMS auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 60 min bei 298 K)

c [μM]	rel. RR + SA	rel. $\bar{\text{UR}}$ + SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
12	102,6 $\pm$ 4,6	89,5 $\pm$ 3,1	1348
118	103,2 $\pm$ 3,2	89,0 $\pm$ 5,9	1643
590	113,6 $\pm$ 3,9*	83,7 $\pm$ 4,2	3507
2360	122,0 $\pm$ 3,8*	83,8 $\pm$ 2,2	3747
5900	125,2 $\pm$ 5,9*	47,0 $\pm$ 3,6	2290
11800	126,6 $\pm$ 1,4*	43,5 $\pm$ 1,9	998
17000	129,7 $\pm$ 0,5*	48,2 $\pm$ 1,0	939

Tabelle 6 : Einfluß von MMS auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

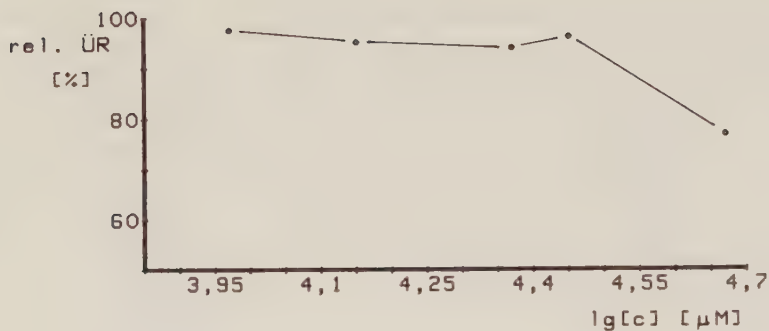


Abb. 9 a : Einfluß von EMS auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 60 min bei 298 K)

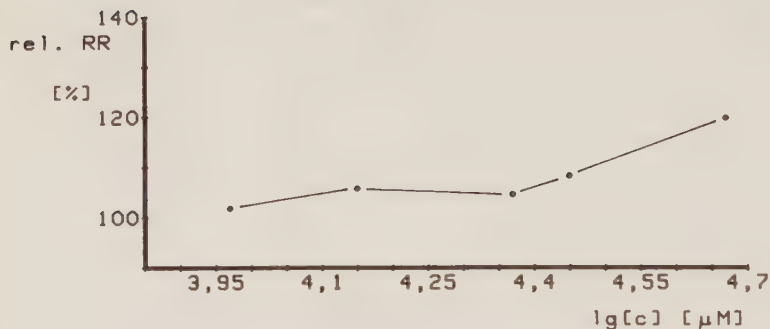


Abb. 9 b : Einfluß von EMS auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 60 min bei 298 K)

c [μ M]	rel. RR + SA	rel $\ddot{U}R$ + SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
9400	101,9 $\pm$ 3,9	97,6 $\pm$ 1,3	2054
14100	105,8 $\pm$ 5,6	95,2 $\pm$ 3,8	1854
23500	104,6 $\pm$ 5,2	94,0 $\pm$ 3,8	1990
28200	108,3 $\pm$ 2,4*	96,2 $\pm$ 1,4	2038
47100	119,8 $\pm$ 3,4*	76,7 $\pm$ 2,8	1630

Tabelle 7 : Einfluß von EMS auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

Parallel zu diesem linearen Anstieg der relativen Rekombinationsrate fällt die relative Überlebensrate bei weiterer Konzentrationserhöhung steil ab (Abb. 8 a, S. 56; Abb. 9 a, S. 58). Unter dem Einfluß von MMS geht sie bis auf 43,5 % zurück (vgl. Tab. 6, S. 57). EMS wirkt dagegen viel weniger toxisch. Hier sinkt die relative Überlebensrate trotz höherer Substanzkonzentrationen verglichen mit MMS nur bis auf 76,7 % (vgl. Tab. 7, S. 59).

Die Unterschiede in der Toxizität der beiden Substanzen gehen auch aus der Gegenüberstellung der UR_{80} - Werte hervor:

	$UR_{80} [\mu M]$	$UR_{50} [\mu M]$
MMS	24,4	178,3
EMS	533,2	/

Um einen besseren Vergleich mit den Nitrosoverbindungen für die Diskussion der Ergebnisse zu haben, wird in der Gegenüberstellung auch der UR_{50} - Wert für MMS angegeben. Dieser läßt sich für EMS nicht errechnen, da die relative Überlebensrate hier bei den getesteten Konzentrationen nicht bis auf 50 % gesenkt wurde.

Deutlich geringere Effekte zeigt EMS auch für seine Wirkung auf die relative Rekombinationsrate, wenn man sie mit denen von MMS vergleicht. EMS beeinflusst diesen Parameter erst in deutlich höheren Konzentrationen, nämlich ab 28200 μM , während MMS schon ab 590 μM signifikante Änderungen der relativen Rekombinationsrate bewirkt. Auch

die Maximalwerte, die für die relative Rekombinationsrate gemessen werden, unterscheiden sich: Während bei EMS mit der höchsten getesteten Konzentration von $47100 \mu\text{M}$ ein Wert von 119,8 % erreicht wird, liegt dieser für MMS in einer Konzentration von $17000 \mu\text{M}$ bei 129,7 %.

Auffallend ist, daß im Gegensatz zu den Messungen mit den Nitrosamiden trotz starker toxischer Effekte von MMS die relative Rekombinationsrate gut und von der relativen Überlebensrate getrennt meßbar ist.

4.5. Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate

In den Abbildungen 10 a und b (S. 62) ist der Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate dargestellt (Meßwerte dazu Tab. 8, S.63).

In Abbildung 10 b lassen sich je nach Hydrolysetemperatur deutliche Unterschiede für den Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Rekombinationsrate erkennen. Bei einer Vorinkubationstemperatur von 296 K wird die Spontanrate der meiotischen Rekombination bei steigender CPA - Konzentration nicht signifikant erhöht. Dagegen ist bei einer Aktivierungstemperatur von 303 K eine dosisabhängige Erhöhung der relativen Rekombinationsrate zu verzeichnen. Diese verläuft allerdings nicht linear. In einem Konzentrationsbereich von $35,8 - 358 \mu\text{M}$ ist ihre Steigung zunächst steiler und flacht dann bis $3580 \mu\text{M}$ ab. Bei den Messungen wird ein Maximalwert von 132,7 % für die relative Rekombinationsrate erreicht.

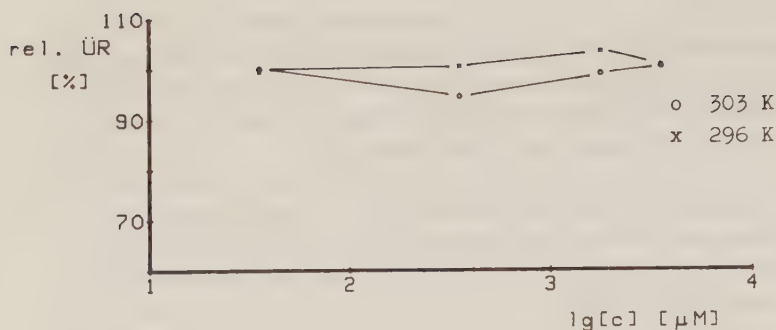


Abb. 10 a : Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* nach sechsständiger Vorinkubation der Substanz bei 296 K und 303 K in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

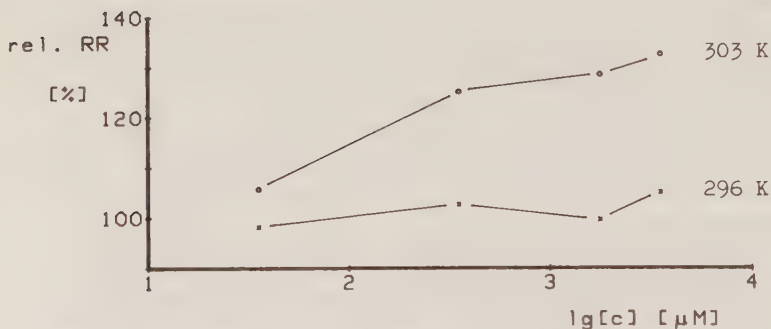


Abb. 10 b : Einfluß von Cyclophosphamid auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* nach sechsständiger Vorinkubation der Substanz bei 296 K und 303 K in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

c [μ M]	rel. RR $\pm$ SA		rel. ÜR $\pm$ SA		Anzahl der untersuchten Zygoten	
	296 K	303 K	296 K	303 K	296 K	303 K
35,8	98,2 $\pm$ 3,7	105,7 $\pm$ 0,9	99,5 $\pm$ 0,1	100,1 $\pm$ 1,1	4712	4400
358,0	102,6 $\pm$ 2,1	125,1 $\pm$ 5,8*	100,4 $\pm$ 4,4	94,4 $\pm$ 5,3	4798	4117
1790,0	99,6 $\pm$ 3,3	128,5 $\pm$ 0,2*	103,3 $\pm$ 3,5	98,9 $\pm$ 1,4	5132	5116
3580,0	105,0 $\pm$ 3,3	132,5 $\pm$ 3,3*	100,6 $\pm$ 2,9	100,3 $\pm$ 1,6	5119	4186

Tabelle 8 : Einfluß von Cyclophosphamid nach sechsstündiger Vorinkubation der Substanz bei 296 K und 303 K auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

Abbildung 10 a (S. 62) macht deutlich, daß die Aktivierung von Cyclophosphamid durch Hydrolyse auch bei höherer Temperatur keinen Einfluß auf die relative Überlebensrate der Zygoten hat. Für beide Hydrolysetemperaturen schwanken die Werte trotz Konzentrationserhöhung statistisch um die Kontrollwerte, so daß sich die Kurven überlagern.

4.6. Einfluß von Natriumnitrit auf die relative Überlebens- und Rekombinationsrate

Durch die Behandlung der Zygoten mit Natriumnitrit kann wie bei den Alkylantien eine Erhöhung der Spontanrate der meiotischen Rekombination in Abhängigkeit von der Konzentration beobachtet werden. Damit zeigt sich, daß das Testsystem nicht nur auf Substanzen einer einzigen Klasse, sondern auf Verbindungen mit verschiedenem Reaktionsmuster reagiert.

Abbildung 11 b (S. 65) zeigt, daß die Konzentrationsabhängigkeit der relativen Rekombinationsrate nicht linear verläuft. In dem Konzentrationsbereich zwischen 125 μM und 1250 μM ist der Anstieg zunächst steiler und flacht dann bis 12500 μM etwas ab. Es wird ein Maximalwert für die relative Rekombinationsrate von 129,7 % erreicht, der also in der Größenordnung der Maximalwerte liegt, die mit MMS und Cyclophosphamid gemessen werden.

Um einen Vergleich mit Messungen in anderen Systemen zu haben, in denen die Experimente mit Natriumnitrit bei niedrigerem pH durchgeführt werden, wird in Tabelle 9 (S. 66) auch die aktuelle HNO_2 - Konzentration bei pH 7

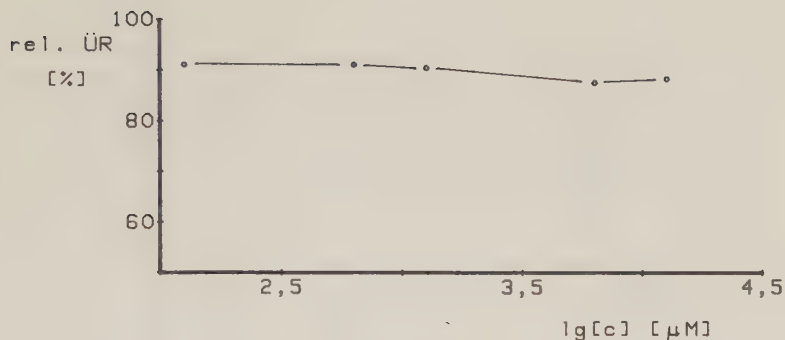


Abb. 11 a : Einfluß von NaNO_2 auf die relative Überlebensrate der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

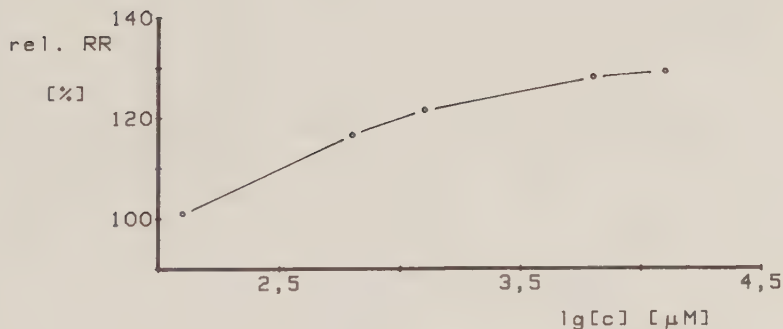


Abb. 11 b : Einfluß von NaNO_2 auf die relative Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration (Behandlung: 30 min bei 298 K)

$c_{\text{NaNO}_2} [\mu\text{M}]$	$c_{\text{HNO}_2} [\mu\text{M}]$	rel. RR + SA	rel. UR + SA	Anzahl der untersuchten Zygoten
125	0,03	101,0 $\pm$ 2,9	91,1 $\pm$ 5,1	3221
625	0,14	116,6 $\pm$ 6,3*	91,2 $\pm$ 4,1	3442
1250	0,28	121,6 $\pm$ 4,4*	90,6 $\pm$ 4,2	3638
6250	1,38	128,2 $\pm$ 2,5*	87,8 $\pm$ 3,7	4328
12500	2,75	129,3 $\pm$ 1,4*	88,6 $\pm$ 6,0	2253

Tabelle 9 : Einfluß von NaNO_2 auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate (Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen)

* statistisch signifikante Erhöhung der relativen Rekombinationsrate

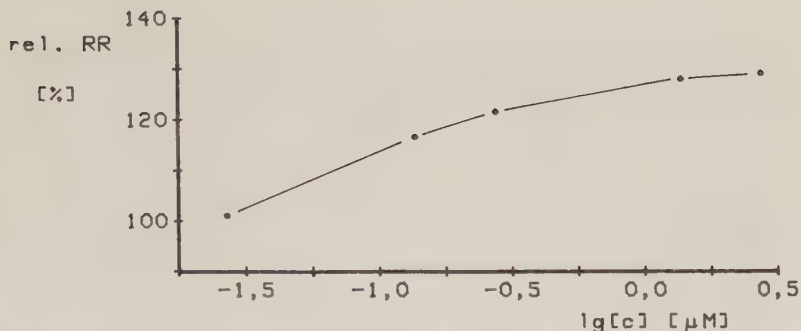


Abb. 12 : Einfluß der aktuellen HNO_2 - Konzentration auf die relative Rekombinationsrate

für die entsprechende NaNO_2 - Konzentration angegeben. Diese läßt sich aus der pH - Abhängigkeit der Hydrolysereaktion von NaNO_2 berechnen. Nach Seel (1970) gilt für den Molenbruch von salpetriger Säure

$$x_{\text{HNO}_2} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKs}}} = 2,2 \cdot 10^{-4}$$

bei einem pKs - Wert für salpetrige Säure von 3,35 (Seel 1970, S. 131). Die Konzentration von HNO_2 bei pH 7 in wäßriger Lösung beträgt also

$$c_{\text{HNO}_2} = 2,2 \cdot 10^{-4} \cdot c_0 ,$$

wobei c_0 für die eingewogene Menge an NaNO_2 steht.

In Abbildung 12 ist die Abhängigkeit der relativen Re-

kombinationsrate von der aktuellen HNO_2 - Konzentration dargestellt. Die Kurve macht die Empfindlichkeit des Testsystems deutlich: Schon bei geringen HNO_2 - Konzentrationen von nur $0,14 \mu\text{M}$ ist ein signifikanter Effekt auf die Rekombinationsrate zu verzeichnen. Eine pH - Erniedrigung würde nicht den Verlauf und damit den gemessenen Effekt ändern, sondern eine Verschiebung der Kurve für NaNO_2 im Bereich der Konzentrationsachse bedeuten.

In diesem Zusammenhang ist auch die geringe Toxizität der Substanz zu verstehen. Abbildung 11 a (S. 65) zeigt den Einfluß steigender NaNO_2 - Konzentration auf die relative Überlebensrate der Zygoten. Hier ist kein dosisabhängiger Effekt zu beobachten. Die relative Überlebensrate wird bei allen getesteten Konzentrationen auf 90 % gesenkt. Infolge des vergleichsweise hohen pH wird relativ wenig HNO_2 gebildet, und damit sind auch nur geringe toxische Effekte zu verzeichnen.

4.7. Einfluß der radikalbildenden Substanzen

Die Experimente, die mit den radikalbildenden Substanzen H_2O_2 und Azobisisobutyronitril durchgeführt wurden, können nicht quantitativ ausgewertet werden. Die unspezifische und starke Reaktivität dieser Verbindungen mit den Molekülen aller zellulärer Strukturen bewirkt eine Störung der Stoffwechselfunktionen der Zygoten. So werden unter dem Einfluß dieser Substanzen nur Kleinkolonien gebildet, die im Gegensatz zu den Kolonien der Kontrollserien eine nur blaßgrüne Farbe aufweisen. Dennoch wächst ein Teil dieser Kolonien auch nach der Übertragung

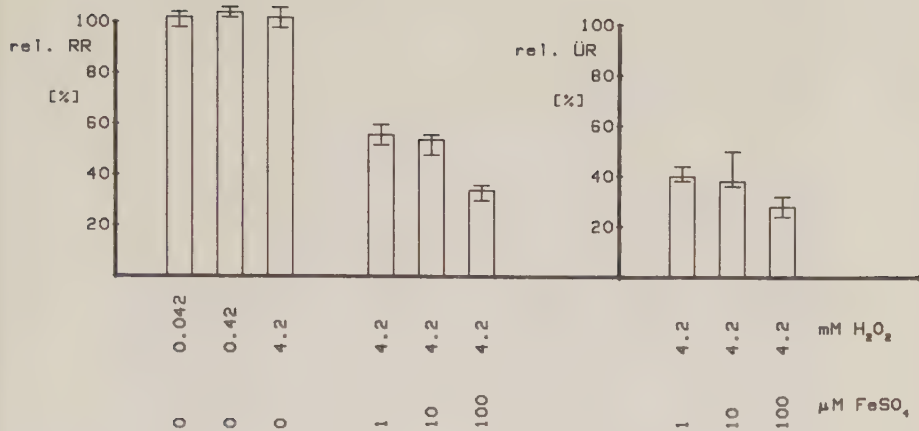


Abb. 13 : Einfluß von H₂O₂ auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate nach Aktivierung durch FeSO₄

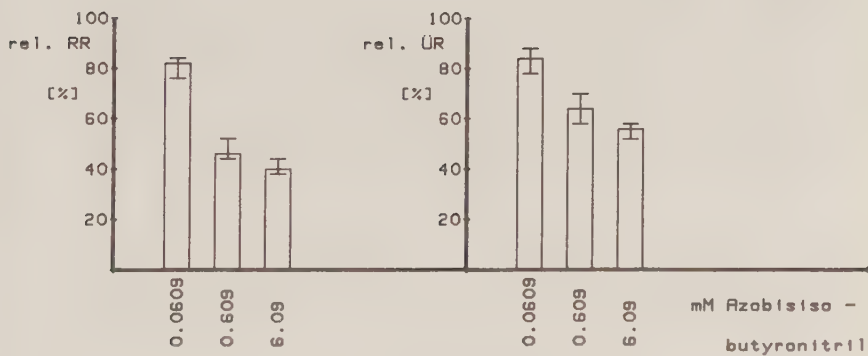


Abb. 14 : Einfluß von Azobisisobutyronitril auf die relative Rekombinations- und Überlebensrate

auf das Minimalmedium. Auch hier zeigen die Kolonien die oben genannten Kriterien.

Die qualitativen Ergebnisse des Einflusses der radikalbildenden Substanzen sind in den Abbildungen 13 und 14 (S. 69) in Säulendiagrammen dargestellt.

H_2O_2 wirkt erst nach Aktivierung der Behandlungslösung mit $FeSO_4$ (Abb. 13). Mit steigender Fe^{2+} - Ionenkonzentration werden sowohl die relative Überlebensrate als auch die relative Rekombinationsrate in zunehmendem Maße gesenkt. Ebenso geht die Erhöhung der Konzentration von Azobisisobutyronitril bei der Behandlung der Zygoten mit einer Senkung beider Parameter dieses Testsystems parallel (Abb. 14). Hieraus kann gefolgert werden, daß diese Effekte durch den Radikalcharakter der beiden Substanzen bedingt sind, die sich bei H_2O_2 erst nach Aktivierung, bei Azobisisobutyronitril dagegen direkt zeigen.

Allerdings muß davon ausgegangen werden, daß die Erniedrigung der relativen Rekombinationsrate kein direkter Effekt ist. Da die beiden Substanzen sehr toxisch wirken, werden Stoffwechselprozesse geschädigt und Enzyme in ihrer Aktivität so eingeschränkt, daß die relative Rekombinationsrate nicht mehr getrennt von der relativen Überlebensrate gemessen werden kann. Damit kann eine Aussage über den Einfluß radikalbildender Substanzen auf die relative Rekombinationsrate in diesem Testsystem nicht gemacht werden.

5. Diskussion

Greift man mit mutagenen Substanzen in ein biologisches System ein, so führt das nach Fahrig (1982) zu preletalen, premutagenen und prerekombinogenen Schäden in der DNA. Diese sind das Substrat für komplexe Repairprozesse, die durch Enzymsysteme gesteuert werden. Die Art und Aktivität der Repairenzyme hängt von der Zyklusphase der behandelten Zelle ab. Diese entscheidet, ob der ursprüngliche Schaden repariert wird, als Mutation fixiert wird oder Rekombination auslöst.

Bei der Standardisierung der Testmethode wurde in dieser Arbeit die Behandlung so festgelegt, daß ein direkter Eingriff durch die Mutagene in die Vorgänge des Crossing-over vor der Hauptreplikationsphase der DNA während der Meiose in *Chlamydomonas reinhardtii* möglich wurde, zwei Prozesse, die eng mit der Rekombination verbunden sind (Machida und Nakai 1980). Die experimentellen Bedingungen wurden so gewählt, daß eine Quantifizierung der rekombinogenen Effekte in reproduzierbarer Weise möglich wurde.

Die reziproke Rekombination während der Meiose ist ein natürlicher Mechanismus, der nicht zu einer Änderung der genetischen Information der DNA im Sinne einer Mutation, sondern zu einer neuen Kombination der elterlichen Eigenschaften führt. Sie beruht auf Crossing-over-Ereignissen zwischen homologen Chromosomen und dient in diesem Testsystem als biologischer Parameter für genetische Veränderungen. Eine Erhöhung der spontanen meiotischen Rekombinationsrate durch Mutagene ist auf die Induktion von Chromosomenveränderungen zurück-

zuführen, die die Prädisposition für Crossing - over - Ereignisse bilden. Diese sind insbesondere Einzelstrangbrüche in den DNA - Strängen, die eine Folge der Reaktion der Mutagene mit der DNA sind.

Bisher stand kein Testsystem zur Verfügung mit der meiotischen Rekombinationsrate als genetischem Endpunkt. Für die Untersuchung rekombinogener Effekte von mutagenen Substanzen wurde insbesondere ein Testsystem mit *Saccharomyces cerevisiae* verwendet (Zimmermann 1973; Zimmermann et al. 1975), in dem die mitotische Rekombination als biologischer Parameter dient. Diese tritt nur in diploiden Organismen auf und ist wie die Mutation ein Parameter, der spontan vergleichsweise selten ausgelöst wird (Nilan und Vig 1976).

Für die Messung der meiotischen Rekombinationsrate wurde für das Testsystem dieser Arbeit der Bereich zwischen den Genen *arg 1* und *arg 7* gewählt, weil durch die Kopplung dieser beiden Gene die spontane Rekombinationsrate relativ gering ist und diese damit einen geeigneten Parameter für ein genetisches Testsystem darstellt. Dieser Genbereich wurde für Untersuchungen zur meiotischen Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* bislang nicht herangezogen, sondern andere Regionen, die auch auf der Kopplungsgruppe I liegen: die *arg 1* - *pab 2* - Region (Lawrence 1965 a, b; Davies 1966; Lawrence und Davies 1967) und die *arg 1* - *arg 2* - Region (Levine und Ebersold 1958; Chiu und Hastings 1973).

Mit Hilfe des Testsystems konnten erstmals reproduzierbar dosisabhängige Effekte von chemischen Mutagenen auf die meiotische Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* gemessen werden. Bislang sind Dosis - Effekt - Studien

in diesem Organismus nur mit γ -Strahlen von Lawrence (1965 a, b, 1967) durchgeführt worden. Eine solche physikalische Behandlung ist verglichen mit einer chemischen in mikrobiellen Testsystemen allgemein unkomplizierter. Folgende Punkte erschweren generell die Durchführung einer chemischen Behandlung:

- 1) Die Zellwand des zu behandelnden Organismus stellt aufgrund ihrer besonderen Permeabilitätseigenschaften eine Barriere zwischen der Behandlungslösung und der Zelle dar. So kann nicht davon ausgegangen werden, daß die applizierte Ausgangskonzentration der Konzentration entspricht, die an die DNA gelangt.
- 2) Das zeitliche Festlegen der Behandlung ist insofern schwierig, als das Auswaschen der Substanz zeitaufwendig ist und somit das Behandlungsende nicht exakt definiert werden kann.
- 3) Es kann bei der Reaktion mutagener Substanzen mit der DNA und Proteinen zur Bildung weiterer reaktiver Produkte nach der Behandlung kommen, die ihrerseits genetische Effekte hervorrufen können.

Bei der Entwicklung und Standardisierung der Testmethode konnten die ersten beiden dieser drei Punkte besonders berücksichtigt werden. Aufgrund ihrer speziellen Wand Eigenschaften stellen die Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* für die Behandlung mit chemischen Mutagenen ein besonderes Problem dar. Als Überdauerungsstadien sind sie unmittelbar nach der Reifungsphase besonders dickwandig und damit auch undurchlässig. Für das Testsystem wurde die Behandlung auch deswegen auf einen relativ späten Zeitpunkt nach Induktion der Meiose festgelegt, so daß die Zygoten wieder dünnwandiger sind und die Substanzen eindringen können.

Mit der Wahl der Filtrationsmethode wurde dadurch, daß sich die Zygoten auf Filtern befinden, eine bequeme und routinemäßig gut durchführbare Behandlung ermöglicht. Durch das Absaugen der Behandlungslösung kann das Ende der Behandlung zeitlich exakt definiert werden.

Die in dieser Arbeit ausgearbeitete Methode erlaubt es, den Effekt auf die Rekombinationsrate und den Effekt auf die Überlebensrate der Zygoten nach Behandlung mit Mutagenen getrennt voneinander in einem Experiment zu messen. Allerdings ist dieses nur bei Behandlungskonzentrationen möglich, die für die Zygoten nicht zu toxisch sind. Dieses soll bei der Diskussion der Effekte radikalbildender Substanzen näher erörtert werden.

Zur Evaluierung des Testsystems wurden bevorzugt Alkylantien eingesetzt. Diese dienen allgemein als Eichsubstanzen für neu entwickelte Testsysteme (Gebhard 1977), da sie auf ihre möglichen genetischen Effekte hin gut untersucht sind. Ihre rekombinogene Potenz konnte in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (Zimmermann et al. 1966; Fahrig 1979, 1982).

Im folgenden sollen die einzelnen Dosis - Effekt - Kurven, die bei der Anwendung alkylierender Substanzen in Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* gemessen werden konnten, diskutiert werden, um anschließend das Testsystem bewerten zu können.

Bei der Beurteilung von Dosis - Effekten, die bei der Anwendung von Alkylantien in biologischen Systemen allgemein gemessen werden, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die durch die alkylierende Substanz und den Testorganismus vorgegeben sind. Das sind:

- 1) die Eigenschaften der Substanz:
 - a) Reaktivität, hier besonders Elektrophilität
 - b) bei bifunktionellen alkylierenden Agentien auch die unterschiedliche Reaktivität der ersten und der zweiten alkylierenden Gruppe
 - c) Stabilität
 - d) sterische Faktoren

- 2) die Eigenschaften des biologischen Organismus
 - a) Fähigkeit zur metabolischen Transformation der Substanz
 - b) Zellwandeigenschaften (Permeabilität)
 - c) sterische Faktoren der Biomoleküle
 - d) Zellzyklusphase

Zunächst werden die Dosis - Effekt - Kurven der vier monofunktionellen alkylierenden Agentien MNNG, ENU, MMS und EMS vergleichend diskutiert. Dafür sind die für diese Substanzen in dem vorliegenden Testsystem gemessenen Parameter einander gegenübergestellt (Tab. 10, S. 76). Das sind die UR_{80} -, UR_{50} - sowie RR_{120} - Werte, wobei letztere angeben, welche Konzentration einer Substanz zu einer Erhöhung der relativen Rekombinationsrate um 20 % führt.

Mit in die Tabelle 10 wurden die jeweilige Behandlungszeit, die Reaktionskinetik der Substanzen sowie physikochemische Daten aus der Literatur, die über Reaktionsmechanismus, Elektrophilität und Reaktivität Auskunft geben, aufgenommen.

Die s - Werte sind Substratkonstanten, die ein Maß für die Empfindlichkeit der alkylierenden Agentien gegenüber der nukleophilen Stärke des Reaktionspartners angeben. Sie leiten sich von der Swain - Scott - Gleichung ab

	Reaktions- kinetik	Behandlungs- zeit [min]	UR ₈₀ [μM]	UR ₅₀ [μM]	RR ₁₂₀ [μM]	s	O ⁶ : N ⁷ - Alky- lierung von Guanin
MMS	S _N ²	60	24,4	178,3	13,2	0,83 1)	0,004 1)
EMS	S _N ² /S _N ¹	60	533,2	/	389,8	0,67 1)	0,03 1)
MNNG	S _N ¹	30	/	0,9	0,096	0,42 2)	0,1 1)
ENU	S _N ¹	30	8,64	59,2	3,81	0,26 2)	0,7 2)

Tabelle 10 : Parameter für die Aktivität der Alkylantien MNNG, ENU, MMS, EMS
Gegenüberstellung von Literaturdaten und Daten aus dem Testsystem
dieser Arbeit

1) Vogel und Natarajan 1982

2) Iawley 1974

(Swain und Scott 1953):

$$\log k_y / \log k_{H_2O} = s \cdot n$$

wobei

k_{H_2O} : Konstante für die Reaktion mit H_2O

k_y : Konstante für die Reaktion mit einem anderen Nukleophil

s : Substratkonstante

n : charakteristische Konstante für das nukleophile Reagenz

Diese Gleichung wurde eingeführt, um die relativen Reaktionsraten verschiedener nukleophiler Reagentien mit elektrophilen Substraten in wäßriger Lösung auszudrücken. Die s - Werte werden häufig für die Korrelation von Alkylierungen mit biologischen Effekten herangezogen (Lawley 1974; Vogel und Natarajan 1982; Bartsch et al. 1983). Vogel und Natarajan (1982) weisen allerdings darauf hin, daß ein direkter quantitativer Vergleich der s - Werte mit biologischen Daten nur in begrenztem Maße möglich ist. Die Werte für die Nitrosoverbindungen wurden aus der Reaktion mit Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , $S_2O_3^{2-}$, die der Alkylalkansulfonate mit CH_3COO^- , HPO_4^{2-} und Anilin gemessen.

Dennoch kann man, wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, allgemein feststellen, daß mit zunehmendem S_N1 - Charakter einer Substanz der s - Wert geringer wird. Das bedeutet, daß die Alkylantien, die vor allem nach einer Kinetik 1. Ordnung mit nukleophilen Substanzen reagieren, unabhängig von der nukleophilen Stärke des Reaktionspartners sowie dessen Konzentration reagieren. Im Gegensatz dazu sind die Alkylantien, die nach dem S_N2 - Mechanismus reagieren, von diesen beiden Faktoren abhängig.

Alkylierung biologischer Moleküle von DNA und Proteinen betrifft besonders Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefelatome, wobei die nukleophile Stärke in der Reihe



zunimmt. Besonders häufig werden in der DNA das N⁷ - Guanin, N³ - Adenin, N³ - Guanin und N³ - Cytosin sowie die Sauerstoffatome der Phosphatgruppen alkyliert (Vogel und Natarajan 1982). Die zunehmende Tendenz nach einem S_N1 - Mechanismus zu reagieren ist also mit einer größeren Tendenz verbunden, das O⁶ - Guanin zu alkylieren. Dieses wird durch das Verhältnis O⁶ : N⁷ - Guanin in Tabelle 10 (S. 76) angegeben.

Ein Vergleich der Literaturdaten mit den Meßdaten aus dem Testsystem dieser Arbeit in Tabelle 10 zeigt, daß sich diese nur annähernd korrelieren lassen. Nach den s- sowie O⁶ : N⁷ - Guanin - Werten ist die Reihenfolge der Reaktivität der Alkylantien:



Den UR- und RR - Werten, die sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, nach ist die Tendenz der größeren Reaktivität der Nitrosoverbindungen gegenüber den Alkylmethansulfonaten ebenfalls zu entnehmen. Dieses wird aus den wesentlich geringeren UR- und RR - Werten für ENU und MNNG gegenüber MMS und EMS deutlich. Allerdings ist hier die Reihenfolge der Substanzen eine andere:



Dieselbe Reaktivitätsabstufung läßt sich aus der Publikation von Fahrig (1979) entnehmen, der diese Substan-

zen mit Ausnahme von ENU in *Saccharomyces cerevisiae* auf ihre Induktion von mitotischer Rekombination hin getestet hat. Dafür, daß mit den Nitrosoverbindungen bei deutlich geringeren Konzentrationen und kürzeren Behandlungszeiten verglichen mit den Alkylmethansulfonaten stärkere Effekte erzielt werden, müssen mehrere Gründe diskutiert werden.

Betrachtet man die Reaktion alkylierender Agentien mit zellulären Molekülen nach dem chemischen Modell von Chandler (1974), so stellt sich nach Eintritt der Substanz in die Zelle bzw. hier die Zygote ein chemisches Gleichgewicht zwischen den Alkylantien auf der einen und der alkylierten DNA auf der anderen Seite ein. Da die Nitrosoverbindungen spontan und MNNG auch durch SH - Gruppen aktiviert (Gichner und Veleminsky 1982) zerfallen, die dabei entstehenden Ionen sehr reaktiv sind und von ihrer Konzentration die Reaktionsgeschwindigkeit abhängt, verlagert sich das Gleichgewicht sofort auf die Seite der Alkylierungsprodukte. Dieses wird in dem Testsystem als linearer Anstieg der Kurve für die relative Rekombinationsrate und nach einer schmalen Schulter als linearer Abfall der Kurve für die relative Überlebensrate gemessen.

Die Alkylmethansulfonate reagieren dagegen als ungeladene Moleküle mit nukleophilen Zentren über einen Übergangszustand. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Alkylierungsreaktion hängt in diesem Fall sowohl von der Konzentration des elektrophilen als auch des nukleophilen Reaktionspartners ab, wobei letztere konstant ist. Nach dem Prinzip von Le Chatelier (Mortimer 1973) kann durch eine Konzentrationserhöhung in diesem Fall der Alkylme-

thansulfonate eine Verschiebung des Gleichgewichts erfolgen. Die niedrigen Konzentrationen, die von MMS (12 μM , 180 μM) und die von EMS (9400 μM , 14100 μM , 23500 μM) getestet wurden, sind zu gering, um diese Verlagerung zu bewirken. Dadurch erklärt sich der Bereich in den Meßkurven für die relative Überlebens- und Rekombinationsrate beider Substanzen, in dem trotz Konzentrationserhöhung keine signifikanten Änderungen für beide Parameter zu verzeichnen sind (Abb. 8, S. 56; Abb. 9, S. 58).

Die Auslösung der Rekombination ist eine Folge der direkten Reaktion der Alkylantien mit der DNA oder mit Enzymen, die rekombinogene Prozesse steuern. Daher muß vermutet werden, daß es für MMS und EMS schwieriger ist, an diese Reaktionszentren zu gelangen. Dieses läßt sich auch aus der Behandlungszeit entnehmen, die für diese beiden Substanzen doppelt so lang gewählt werden muß wie für MNNG und ENU, um in dem Testsystem rekombinogene Effekte zu erzielen.

Hier muß berücksichtigt werden, daß die Moleküle der Alkylmethansulfonate besonders von H_2O , das im Überschuß in der Behandlungslösung vorliegt, abgefangen werden und somit an dem Eintritt in die Zygote gehindert werden. Dieses erklärt ebenfalls, daß eine Konzentrationserhöhung zunächst keine rekombinogenen und toxischen Effekte zur Folge hat. Die Nitrosoverbindungen sind dagegen, wie bereits erwähnt, unabhängig von der nukleophilen Stärke des Reaktionspartners. Sie werden also nicht in dem Maße von H_2O - Molekülen abgefangen, so daß sie sofort an die reaktiven Zentren der DNA gelangen und dort genetische Veränderungen hervorrufen können.

MMS und EMS reagieren aufgrund ihres S_N2 - Charakters auch zunächst mit Molekülen der Zellwand, z. B. Proteinen, die eine hohe Nukleophilität aufweisen (Smith und Grisham 1983). Diese Reaktion kann die Permeabilitätseigenschaften der Zellwand (Smith und Grisham 1983) bzw. hier der Zygotenwand ändern, was den Alkylmethansulfonaten den Eintritt in die Zygoten erschwert.

Auch sterische Effekte müssen in diesem Zusammenhang diskutiert werden. Die Nitrosoverbindungen liegen unter den gewählten experimentellen Bedingungen zum größten Teil in ionischer Form vor. Ihre Moleküle sind gegenüber denen der Alkylmethansulfonate klein und geladen. Dieses führt dazu, daß sterische Effekte für das Eindringen von MNNG und ENU in die Zygote und ihre Reaktion mit DNA und Proteinen eine wesentlich geringere Bedeutung haben. Für MMS und EMS kann man dagegen annehmen, daß sie aufgrund ihrer Größe sterisch gehindert sind, in die Zygote zu gelangen und mit zellulären Molekülen zu reagieren. Diese sterische Hinderung wird zusätzlich dadurch verstärkt, daß die Alkylmethansulfonate aufgrund ihres Reaktionsmechanismus über einen Übergangszustand mit dem Reaktionspartner reagieren.

Im folgenden wird die unterschiedliche Reaktivität der Nitrosoverbindungen untereinander auf der einen und der Alkylmethansulfonate untereinander auf der anderen Seite diskutiert.

Wie Tabelle 10 (S. 76) deutlich macht, entspricht die größere Reaktivität von MNNG verglichen mit ENU nicht den in der Literatur angegebenen physikochemischen Daten (Lawley 1974; Vogel und Natarajan 1982). Auch in *Salmonella typhimurium* haben Bartsch et al. (1983) beispielsweise

se eine stärkere mutagene Aktivität von ENU gegenüber MNNG im Plattentest mit dem Stamm TA 100 und TA 1535 gemessen, während sich die beiden Substanzen im Flüssigtest mit diesen beiden Stämmen in ihrer Mutagenität genau umgekehrt verhalten: Wie auch in dem vorliegenden Testsystem auf Induktion meiotischer Rekombination ist MNNG stärker wirksam als ENU.

Ein Grund dafür, daß in den Experimenten dieser Arbeit höhere Konzentrationen von ENU appliziert werden müssen, um dieselben Effekte zu erzielen wie mit MNNG, ist in dem Stabilisator zu sehen, der ENU zugesetzt ist. Dieser hemmt den spontanen Zerfall und damit die Bildung der Ethylkationen. So ist die Wirksamkeit, die die Reinsubstanz hat, herabgesetzt.

Von untergeordneter Bedeutung könnten auch hier sterische Effekte sein. Das aus ENU gebildete Ethylkation ist größer als das Methylkation, das beim Zerfall von MNNG entsteht. Letzteres kann dadurch auch sterisch ungünstig gelegene nukleophile Moleküle in der DNA besser erreichen.

Deutlich wird in den Abbildungen 4 a (S. 44) und 5 a (S. 46) die Übereinstimmung in dem geschulterten Verlauf der Kurven, die für den Einfluß von MNNG und ENU auf die Überlebensrate gemessen werden. Der geschulterte Bereich ist hier wesentlich schmaler als bei den Kurven für die Effekte von MMS (Abb. 8 a, S. 56) und EMS (Abb. 9 a, S. 58) auf die Überlebensrate und hat andere Ursachen. Zieht man zu ihrer Interpretation die "Multi - Hit - Hypothese" aus der Strahlenbiophysik (Niemann 1982) heran, so sind mehrere Alkylierungen pro Zygote notwen-

dig, um toxische Effekte hervorzurufen. Bei geringen Konzentrationen ist hier der Schaden durch die Alkylierung für die Zygoten tragbar, oder er wird gut repariert. Für die toxischen Effekte müssen neben der Schädigung von Enzymen, die die Rekombinationsprozesse steuern, durch Alkylierung weitere Punkte diskutiert werden. So geben Gichner und Veleminsky (1982) auch die Nitroamidierung von Proteinen durch MNNG an, die ebenfalls zu einer Einschränkung der Funktion wichtiger Enzyme beiträgt und damit die Überlebensrate einschränkt.

Für ENU diskutiert Knox (1976) die Bildung von Cyanat, das beim Zerfall dieser Substanz entsteht und im vorliegenden Fall die Zygoten irreversibel in ihrem Stoffwechsel schädigt.

Die rekombinogene und toxische Wirkung von MMS ist stärker als die von EMS. Dieses stimmt überein mit Daten für die Mutagenität dieser Substanzen in vegetativen Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* (Loppes 1966, 1968). Wie bereits erwähnt findet auch Fahrig (1979) dieselbe Reaktivitätsabstufung für die beiden Alkylmethansulfonate in *Saccharomyces cerevisiae* für die Induktion mitotischer Rekombination, ebenso wie Mahna und Rhaese (1983) für die Mutationsauslösung in *Bacillus subtilis*. Bei anderen Objekten wie *Schizosaccharomyces pombe* (Loprieno 1966), *Escherichia coli* und *Drosophila* (Alderson 1964) wird dagegen eine stärkere Wirkung von EMS verglichen mit MMS beobachtet.

Die stärkere Wirkung von MMS kann auf sterischen Effekten beruhen. Nach Loppes (1966) ist es für das größere EMS - Molekül sterisch weniger gut möglich, Proteine zu alkylieren. So kann man sich seine geringeren toxischen Effekte erklären. Dasselbe könnte auch für die Alkylie-

rung der DNA und damit verbunden die Auslösung der Rekombination gelten.

Da EMS nach Margison und O'Connor (1979) auch in geringerem Maße O^6 - Atome des Guanins alkyliert, die wesentlich stabiler sind als Alkylierungen der Stickstoffatome, wäre auch zu vermuten, daß nach MMS - Behandlung mehr Einzelstrangbrüche in der DNA entstehen, da die Alkylierungen der Stickstoffatome leichter hydrolytisch gespalten werden. Dieses böte mehr Möglichkeiten für rekombinogene Prozesse nach MMS - Behandlung.

Die Ergebnisse, die bei der Behandlung der Zygoten mit DMN erzielt wurden, werden isoliert von denen, die mit den beiden Nitroverbindungen MNNG und ENU gemessen wurden, diskutiert. Sie unterscheiden sich grundsätzlich voneinander, was an der großen Stabilität von DMN liegt. Interessanterweise kann in dem vorliegenden Testsystem bei direkter Anwendung der Substanz im Unterschied zu anderen mikrobiellen Testorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Brusick und Andrews 1974), *Salmonella typhimurium* (Prival et al. 1979) und *Neurospora crassa* (Malling 1966) eine genetische Aktivität gemessen werden. Das deutet darauf hin, daß sich die Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* wie Zellen höherer Pflanzen verhalten. Auch in höheren Pflanzen konnte nämlich eine genotoxische Wirkung ohne enzymatische oder hydrolytische Aktivierung der Substanz in vitro nachgewiesen werden (Gichner et al. 1982). *Arabidopsis thaliana* ist hier besonders intensiv untersucht worden (Veleminsky und Gichner 1968, 1971; Gichner et al. 1980; Gichner und Veleminsky 1984). Obwohl bekannt ist, daß

in höheren Pflanzen Monooxidasen und Cytochrom P 450 in der Elektronentransportkette vorliegen (Rich und Bendall 1975), die für die Metabolisierung von DMN in Frage kommen, konnte man die Enzyme, die für die Metabolisierung von DMN in *Arabidopsis thaliana* verantwortlich sind, noch nicht näher charakterisieren (Gichner und Veleminsky 1984).

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, daß auch in den Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* Enzyme vorliegen, die in der Lage sind, DMN zu aktivieren. Publikationen über eine Charakterisierung solcher Enzyme liegen allerdings nicht vor. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Kurvenverlauf, der für den dosisabhängigen Einfluß von DMN auf die relative Rekombinationsrate gemessen wird. Die Kurve, die zwischen einer Konzentration von $14 \mu\text{M}$ und $680 \mu\text{M}$ steil ansteigt und dann bis $13500 \mu\text{M}$ in einem Sättigungsbereich ausläuft, zeigt Parallelen zu Ergebnissen, die Gletten et al. (1975) publiziert haben. Sie entwickelten einen Test für die Untersuchung der enzymatischen in vitro - Aktivierung von DMN in seine aktive Form. Die quantitative Messung der Mutagenität von DMN in Abhängigkeit von steigender Enzymkonzentration bei konstanter DMN - Konzentration sowie in Abhängigkeit von steigender DMN - Konzentration bei konstanter Enzymkonzentration ergeben jeweils eine Sättigungskurve. Danach könnten die Ergebnisse dieser Arbeit so interpretiert werden, daß ein Enzympool DMN in den Zygoten aktiviert. Die Kapazität dieses Enzympools ist jedoch begrenzt, so daß ab einer DMN - Konzentration von $680 \mu\text{M}$ eine Dosiserhöhung keine weitere Steigerung der Rekombinationsrate bewirkt. Was über diese Konzentration hinaus in die Zygote gelangt, wird

nicht aktiviert.

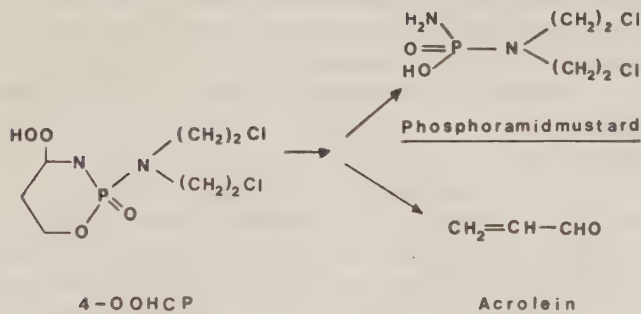
Die Kurve, die für den Effekt von DMN auf die relative Überlebensrate gemessen wird (Abb. 7b, S. 53), zeigt, daß im Gegensatz zu MNNG und ENU kaum toxische Effekte erzielt werden. Es gibt allerdings keine Hinweise, die dieses Ergebnis erklären könnten.

Anders sind die Ergebnisse, die mit Cyclophosphamid erzielt wurden, zu interpretieren. Wie Abbildung 10 b (S.62) sowie die Werte in Tabelle 8 (S. 63) zeigen, kann eine rekombinogene Aktivität von Cyclophosphamid nach sechs-stündiger Hydrolyse in dem Testsystem nachgewiesen werden. Dabei wird deutlich, daß die Temperatur für die Bildung genetisch aktiver Abbauprodukte innerhalb des Hydrolyse-zeitraums ausschlaggebend ist. Im Gegensatz zu den Versuchsansätzen bei 296 K kann bei einer Temperatur von 303 K ein signifikanter dosisabhängiger Effekt nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Veröffentlichungen über die Wirkung von hydrolysiertem Cyclophosphamid in *Saccharomyces cerevisiae* (Mayer 1976; Fleer et al. 1982) und *Vicia faba* (Michaelis und Rieger 1961). Dagegen zeigt Abbildung 10 a (S. 62), daß die toxische Aktivität durch die Hydrolysetemperatur nicht beeinflusst wird.

Obwohl der genaue Mechanismus der toxischen Wirkung von Cyclophosphamid noch nicht aufgeklärt ist, wird die Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb eines DNA - Strangs sowie zwischen zwei DNA - Strängen für die inaktivierende Wirkung von Stickstofflost - Verbindungen und deren Abkömmlingen verantwortlich gemacht (Fox und

Scott 1980). Bifunktionelle Abbauprodukte von Cyclophosphamid, die stark toxische Wirkungen hervorrufen, werden allerdings nur bei enzymatischer Aktivierung gebildet. Nach Hales (1982) entsteht zunächst 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OHCP), das zu Phosphoramidmustard und Acrolein weiter zerfällt



Nach Hydrolyse entsteht dagegen ein monofunktionelles Abbauprodukt (S. 38), dessen Bildung durch Metallionen im biologischen Organismus katalysiert wird (Fleer et al. 1982). Von diesem Abbauprodukt können keine kovalenten Bindungen zwischen DNA - Molekülen ausgebildet werden. Seine toxische Wirkung muß wesentlich geringer sein. Tatsächlich finden Fleer et al. (1982) in *Saccharomyces cerevisiae* dieselbe Inaktivierungsrate der Zellen nach zwölfstündiger Behandlung mit einer 1000fach höheren Konzentration von hydrolysiertem Cyclophosphamid verglichen mit dem durch enzymatischen Abbau entstandenen 4-Hydroxycyclophosphamid.

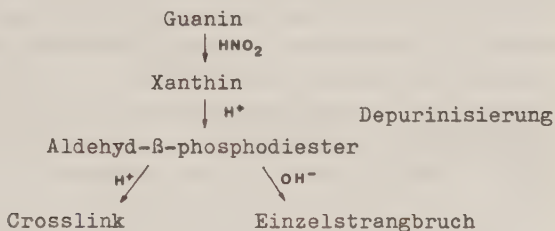
Dieses muß auch bei der Interpretation der Ergebnisse

dieser Arbeit zugrunde gelegt werden. Die rekombinogene Aktivität der Abbauprodukte von Cyclophosphamid ist hier auf ihren monofunktionellen Charakter zurückzuführen. Die bei der Alkylierung von Biomolekülen entstandenen Schäden unterliegen offensichtlich einem effektiven Repair und bewirken keine Inaktivierung der Zygoten (Abb. 10 a, S. 62). Wenn Fleer et al. (1982) höhere toxische Werte für Cyclophosphamid nach hydrolytischem Abbau erreichen, muß beachtet werden, daß bei ihren Experimenten die Vorinkubationszeit 15 bzw. 72 Stunden, die Hydrolysetemperatur 310 K beträgt und die Behandlungszeit bis zu 30 Stunden dauert.

Auch die nicht - alkylierende Verbindung NaNO_2 zeigt in dem Testsystem genetische Aktivität. Wie Fahrig (1982) für die Wirkung von NaNO_2 auf die mitotische Rekombinationsrate in *Saccharomyces cerevisiae* findet, wird auch die meiotische Rekombinationsrate in *Chlamydomonas reinhardtii* dosisabhängig erhöht. Jedoch unterscheiden sich die Bedingungen der Experimente von Fahrig von denen dieser Arbeit insofern, als sie von Fahrig bei pH 4, in dieser Arbeit dagegen bei pH 7 durchgeführt wurden. Das bedeutet, daß in der Behandlungslösung mit pH 7 die Konzentration an HNO_2 geringer ist als bei pH 4. Dennoch reagiert das System, wie die Abbildungen 11 b (S. 65) und 12 (S. 67) zeigen, empfindlich auf die Behandlung.

Burnotte und Verly (1971), die die Kinetik der genotoxischen Wirkung von HNO_2 untersuchten, stellten darüber hinaus fest, daß auch die durch HNO_2 bedingte Crosslink - Bildung pH - abhängig ist. So liegt die Crosslink - Rate bei pH 4,5 drei Mal höher als bei pH 6,9. Zu beachten

ist, daß die Crosslink - Bildung durch HNO_2 sterisch besonders günstige Verhältnisse in der DNA erfordert. Im Gegensatz zu bifunktionellen Agentien, die in der DNA interkalieren, erfolgt die Crosslink - Bildung durch HNO_2 durch direkte Kopplung zweier DNA - Moleküle (Singer und Kusmierek 1982). Nach dem von Burnotte und Verly (1971) veröffentlichten Schema werden bei saurem und basischen pH unterschiedliche genetische Konsequenzen hervorgerufen:



Mit diesem Schema kann die geringe Toxizität von NaNO_2 (Abb. 11 a, S. 65) erklärt werden. Geht man davon aus, daß die H^+ - Konzentration ausreicht, um eine Depurinisierung von Xanthin hervorzurufen, so sind theoretisch zwei weitere Reaktionen denkbar: Die Crosslink - Bildung oder die Induktion von Einzelstrangbrüchen. Nach Brendel und Ruhland (1984) hätte die Crosslink - Bildung eine starke Inaktivierung der Zygoten zur Folge. Aufgrund des pH - Werts der Behandlungslösung für die Experimente der vorliegenden Arbeit kann man davon ausgehen, daß in besonderem Maße Einzelstrangbrüche induziert werden. Diese unterliegen offenbar einem guten Repair, so daß die Schädigung der Zygoten nur gering ist.

Die vergleichenden Untersuchungen mit H_2O_2 und Azobisisobutyronitril zeigen, daß Substanzen, die Radikale bilden, in diesem System quantitativ nicht untersucht werden können. Aufgrund ihrer großen Reaktivität reagieren sie mit allen zellulären Molekülen. Das bewirkt bei einer Einwirkungszeit von nur 15 Minuten bereits starke toxische Effekte, die eine metabolische Inaktivierung zur Folge haben. Dabei ist die Keimungsfähigkeit der Zygoten nicht total eingeschränkt, doch werden nur blaßgrüne Kleinkolonien gebildet. Es muß angenommen werden, daß auch Enzyme, die Rekombinationsprozesse steuern, geschädigt werden. Radikalbildner können deswegen nicht als rekombinations-senkende Substanzen verstanden werden. Die Erniedrigung der Rekombinationsrate muß hier auf die toxische Wirkung der Substanzen zurückgeführt werden.

Am Beispiel der radikalbildenden Substanzen wird deutlich, daß eine Trennung von relativer Überlebens- und Rekombinationsrate mit der erstellten Testmethode nur bei Behandlungskonzentrationen möglich ist, die oberhalb eines toxischen Grenzwertes liegen. Wird die Überlebensrate zu stark beeinträchtigt, kann die Rekombinationsrate nur noch in einer geringen Anzahl überlebender Zygoten gemessen werden. Dies macht eine quantitative Auswertung unmöglich. Der toxische Grenzwert läßt sich jedoch nicht allgemein festlegen, sondern er ist für jede Testsubstanz individuell zu bestimmen.

Dieses geht auch aus den Ergebnissen, die mit MNNG und ENU erzielt wurden, hervor. Beide haben trotz eines gleichen Wirkungsmechanismus unterschiedliche Schwellenkonzentrationen (für MNNG $c > 68 \mu M$, für ENU $c > 1240 \mu M$), oberhalb derer keine dosisabhängige Messung rekombino-

gener Effekte in dem Testsystem möglich ist.

Weitere Faktoren, die den Einsatz des Testsystems begrenzen, müssen diskutiert werden. So spielt die Löslichkeit der Testsubstanz eine wichtige Rolle. Da die Behandlung der Zygoten nur in wäßriger Lösung durchgeführt werden kann, können wasserunlösliche Substanzen nur begrenzt untersucht werden. Dabei muß bemerkt werden, daß ein Einsatz solcher Substanzen in mikrobiellen Testsystemen allgemein problematisch ist. Als Beispiel ist hier 2-Nitrofluoren zu nennen, das in dem vorliegenden Testsystem nicht geprüft werden konnte.

Auch die Behandlungszeit ist limitiert durch die Länge der Meiosephase, in der die Behandlung durchgeführt wird. Wie auch Davies und Lawrence (1967), Lawrence und Davies (1967) sowie Chiu und Hastings (1973) zeigen konnten, reagieren verschiedene Meiosestadien mit unterschiedlicher Empfindlichkeit auf eine chemische Behandlung. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist es deswegen notwendig, daß eine Behandlungszeit von 60 Minuten in diesem Testsystem nicht überschritten wird. Nach Ergebnissen eigener Experimente können Furocumarine beispielsweise nicht eingesetzt werden, da sie eine längere Applikationszeit erfordern.

Abschließend soll diskutiert werden, wie es durch die Behandlung der Zygoten mit Alkylantien und NaNO_2 zu einer signifikanten Erhöhung der Rekombinationsrate während der Meiose kommt. Von vielen Autoren wird postuliert, daß die Rekombination ein Repairmechanismus in Eukaryonten ist (Cox 1978). Das bedeutet, daß die Rekombination nicht nur die Funktion der Neukombination

des Erbguts hat, sondern auch Fehler in der Eltern - DNA ausmerzt, so daß diese nicht auf die folgende Generation übertragen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Coffein die Rekombinationsrate nicht nur nach UV - Behandlung der Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii*, wie es Portney und Rosen (1980) fanden, sondern auch bei ENU - Behandlung beeinflußt. Ein Effekt von Coffein allein ist in der verwendeten Konzentration von 1,5 mg/ml nicht zu beobachten. Das könnte darauf hinweisen, daß nach der Alkylierung der DNA durch ENU auch Enzyme des Rekombinationsrepairs aktiviert werden, um die Schäden in der DNA zu reparieren. Ihre Aktivität kann durch Coffein modifiziert werden. Obwohl nach Putrament (1972) Coffein verschiedene molekulare Prozesse beeinflußt, konnte der Mechanismus der Coffein - Effekte auf Repairprozesse bislang nicht aufgeklärt werden. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sind für die modifizierende Wirkung von Coffein auf die relative Rekombinationsrate bei ENU - Behandlung folgende Gründe möglich:

- a) eine Wechselwirkung von Coffeinmolekülen mit der geschädigten DNA - Stelle
- b) eine modifizierende Wirkung von Coffein auf die Enzyme des Rekombinationsrepairs.

Harm (1970) konnte zeigen, daß Coffein in *Escherichia coli* nach UV - Behandlung Komplexe mit den geschädigten DNA - Stellen eingeht. Für die Wirkung von Coffein auf die DNA in Wurzelspitzen von *Vicia faba*, die durch Alkylierung geschädigt wurde, nehmen Zuk und Swietlinska (1973) ebenfalls eine solche Komplexbildung an. Postuliert man eine Komplexbildung von Coffein auch nach ENU - Schädigung der DNA der Zygoten von *Chlamydomonas*

reinhardtii, so könnten diese Komplexe eine direkte Wirkung auf die Aktivität der Enzyme haben, die beim Repair dieser DNA - Schäden eine Rolle spielen. Dieses könnte in der Weise erfolgen, daß die Enzyme, die für die Exzision der alkylierten DNA verantwortlich sind, durch den Komplex inhibiert werden (Yamamoto und Yamaguchi 1969).

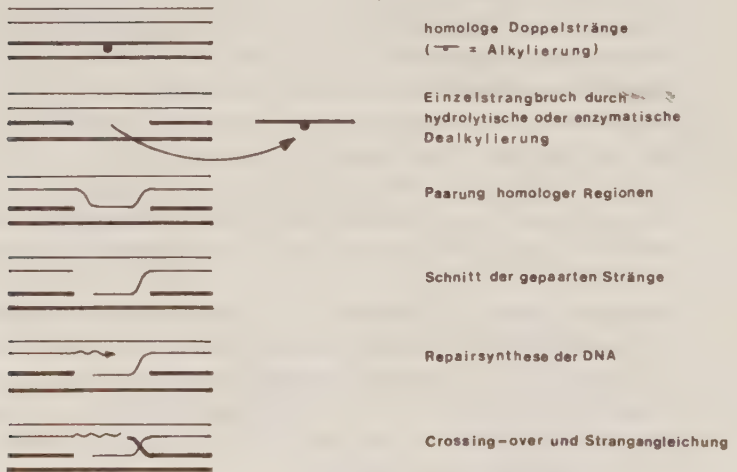
Eine andere Möglichkeit wäre, daß der DNA - Coffein - Komplex nur mit den Enzymen des Rekombinationsrepairs in Wechselwirkung treten kann, so daß sich andere Repairenzyme wie die des Exzisionsrepairs nicht an die geschädigte Stelle anlagern können.

Beides würde die Wirkung der Rekombinationsenzyme fördern und könnte so eine Steigerung der Rekombinationsrate hervorrufen.

Eine signifikante Erhöhung der relativen Überlebensrate wird durch Coffein erst bei der höchsten getesteten ENU - Konzentration erreicht. Das könnte so zu erklären sein, daß ohne gleichzeitige Coffein - Behandlung ENU - Schäden durch einen Exzisions- und Rekombinationsrepair repariert werden. Wird durch Coffein der Exzisionsrepair wie oben postuliert ausgeschaltet, macht sich das in dem niedrigen, wenig toxischen Konzentrationsbereich nicht bemerkbar. Bei der höchsten der drei untersuchten ENU - Konzentrationen dagegen, durch die die relative Überlebensrate unter 70 % gesenkt wird, könnte die Ausschaltung des Exzisionsrepairs durch Coffein bewirken, daß der jetzt allein aktive Rekombinationsrepair wirksamer ist. Das bedeutet, daß die Alkylierungsschäden effektiver repariert werden, so daß die relative Überlebensrate signifikant erhöht wird.

Nach den gängigen Modellen sind Einzelstrangbrüche in der DNA Voraussetzung für rekombinogene Prozesse (Howard-

Flanders et al. 1984). Solche Einzelstrangbrüche können in der DNA nach der Alkylierung der Nukleinsäuren entstehen. Von den Nitrosoverbindungen werden insbesondere O^6 - Guanin, N^7 - Guanin, N^3 - Adenin und Phosphodiester alkyliert, von den Alkylmethansulfonaten besonders N^7 - Guanin und N^3 - Adenin (Vogel und Natarajan 1982), wobei EMS auch in geringem Maße O^6 - Guanin alkyliert (Margison und O'Connor 1979). Solche Alkylierungen können spontan oder durch enzymatische Exzision zu einer Dealkylierung und damit zu einem Strangbruch führen. Diese Strangbrüche entstehen auch nach $NaNO_2$ - Behandlung unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit (s. S. 89). Durch Rekombination können diese repariert werden, wie es das folgende Modell zeigt:



(nach Howard-Flanders et al. 1984)

Eine weitere Möglichkeit für die Induktion von Einzelstrangbrüchen nach Alkylierung leitet sich von dem "Gapped - Synthesis Modell" von Howard-Flanders (1981) ab. Er findet, daß Schäden in der DNA - Matrize in *Escherichia coli* die Neusynthese der Tochterstränge bei der Replikation in kurzen Abschnitten blockieren. So kommt es in der neu synthetisierten DNA zu Gaps, die ebenfalls durch rekombinogene Prozesse wieder repariert werden können.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Standardmethode für die Messung von rekombinogenen Effekten in *Chlamydomonas reinhardtii* steht ein weiteres Testsystem zur Verfügung mit einer Alge als Testorganismus. Ein solches Testsystem hat für sich gesehen nur eine begrenzte Aussagekraft, da die genetischen und metabolischen Besonderheiten des Testorganismus für eine Risikoanalyse nicht uneingeschränkt auf den menschlichen Organismus übertragen werden können. Um das genetische Risiko von Substanzen beurteilen zu können, hat man Testbatterien entwickelt, eine Kombination von ausgewählten Testsystemen mit verschiedenen Testorganismen und genetischen Endpunkten (Ashby 1982; Dean und Hodges 1982). Diese Testbatterien können Informationen über das Spektrum der biologischen Aktivität von Testsubstanzen geben.

Algen wurden in solchen Testbatterien als Testorganismen bislang nicht berücksichtigt. In Verbindung mit früheren Befunden an vegetativen Zellen (Schimmer 1977, 1980) legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, Algentestsystemen mehr Bedeutung zu schenken. Algen verfügen über einen besonderen phototrophen Metabolismus und besitzen offensichtlich Enzyme, über die andere Mikroor-

ganismen nicht verfügen. Dieses zeigen insbesondere die rekombinogenen Effekte von DMN in den Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii*. Dabei sind die Parallelen, die sich hier zu höheren Pflanzen ergeben, von besonderer Bedeutung.

Pflanzliche Testsysteme sollten auch deswegen stärker berücksichtigt werden, weil chemische Substanzen in pflanzlichen Organismen über besondere Stoffwechselwege metabolisiert werden und Pflanzen in der Nahrungskette des Menschen besondere Bedeutung haben. Es wird deshalb angeregt, Testsysteme mit *Chlamydomonas reinhardtii* als Ergänzung zu anderen Testsystemen in Testbatterien aufzunehmen, da sie wertvolle Informationen über die genetische Aktivität mutagener Substanzen liefern.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode für ein Testsystem entwickelt, mit der im generativen Zyklus von *Chlamydomonas reinhardtii* der Einfluß chemischer Mutagene auf die meiotische Rekombinationsrate dosisabhängig gemessen werden kann. Durch die Applikation einer jeweils konstanten Zahl reifer Zygoten auf Membranfilter wird es möglich, diese unter konstanten Bedingungen in einem definierten Meiosestadium zu behandeln. In dem Testsystem kann gleichzeitig die toxische Wirkung der angewendeten Substanzen getrennt von ihren rekombinogenen Effekten untersucht werden.

Für die Evaluierung des Testsystems wurden, wie allgemein üblich, insbesondere alkylierende Agentien angewendet. Für diese konnte eine dosisabhängige Erhöhung der meiotischen Rekombinationsrate reproduzierbar gemessen werden.

Die toxischen und rekombinogenen Effekte der monofunktionellen, direkt wirksamen Agentien MNNG und ENU auf der einen sowie MMS und EMS auf der anderen Seite unterscheiden sich in dem entwickelten Testsystem deutlich voneinander und lassen sich mit den physikochemischen Eigenschaften dieser Substanzen korrelieren.

Eine Besonderheit stellt das stabile DMN dar, das im Gegensatz zu allen anderen mikrobiellen Testsystemen in den Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* ohne enzymatische in vitro - Aktivierung wirksam ist. Die Zygoten von *Chlamydomonas reinhardtii* verfügen offensichtlich wie die Zellen höherer Pflanzen über Enzyme, die DMN zu genetisch wirksamen Abbauprodukten metabolisieren. Diese zeigen in dem

Testsystem rekombinogene, aber nur schwache toxische Effekte.

Cyclophosphamid wirkt erst nach sechsstündiger Hydrolyse bei 303 K vor der Behandlung rekombinogen, aber nicht toxisch. Diese Befunde lassen sich durch den monofunktionalen Charakter der Abbauprodukte, die durch nicht - enzymatische Aktivierung dieser Substanz entstehen, erklären.

Auch nicht - alkylierende Substanzen zeigen Effekte in dem entwickelten Testsystem.

Mit NaNO_2 kann unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit ebenfalls eine dosisabhängige Erhöhung der Rekombinationsrate gemessen werden. Die Überlebensrate wird dagegen nur schwach beeinflußt.

Für die Wirkung der radikalbildenden Substanzen H_2O_2 und Azobisisobutyronitril ist dagegen nur eine qualitative Auswertung der experimentellen Ergebnisse möglich. Beide Substanzen zeigen starke toxische Effekte, wobei Azobisisobutyronitril direkt wirksam ist und H_2O_2 erst durch Fe^{2+} - Ionen aktiviert werden muß. Die geringe Anzahl der überlebenden Zygoten erlaubt keine statistisch gesicherte Aussage über die rekombinogene Wirkung der beiden Substanzen.

Der modifizierende Effekt von Coffein auf die rekombinogenen Eigenschaften von ENU in diesem System deutet darauf hin, daß die meiotische Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht nur für die Neukombination des Erbguts verantwortlich ist, sondern auch als Repairmechanismus fungiert, der Schäden in der DNA vor der Weitergabe auf die Tochtergeneration eliminiert.

7. Literaturverzeichnis

Adler I.D. :

The problem of caffeine mutagenicity
in: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man, Vogel, F.,
Röhrborn, G. (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 1970, 383-403

Alderson, T. :

Ethylation versus methylation in mutation of E. coli
and Drosophila
Nature 203 (1964), 1404-1405

Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki :

Methods for detecting carcinogens with the Salmonella/
mammalian-microsome mutagenicity test
Mut. Res. 31 (1975), 347-364

Arenaz, P., B.K. Vig :

Somatic crossing-over in Glycine max (L.) merrill:
Activation of dimethyl nitrosamine by plant seeds and
comparison with methyl nitrosourea in inducing somatic
mosaicism
Mut. Res. 52 (1978a), 367-380

Arenaz, P., B.K. Vig :

Somatic mosaicism induced by some carcinogens in soy-
bean (Glycine max)
Mut. Res. 53 (1978 b), 147

Arnold, C.G. :

The induction of extrakaryotic mutations

in: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man, Vogel F.,
Röhrborn, G. (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 1970, 285-293

Ashby, J. :

Screening chemicals for mutagenicity: practices and
pitfalls

in: Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology,
Academic Press, 1982, 1-33

Bartsch, H., B. Terracini, C. Malaveille, L. Tomatis,
J. Wahrendorf, G. Brun, B. Dodet :

Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity
and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating
agents and of the initial O⁶:7-alkylguanine ratio in
DNA with carcinogenic potency in rodents

Mut. Res. 110 (1983), 181-219

Bignami, M., F. Aulicino, A. Velich, A. Carere, G. ~
Morpurgo :

Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in
Aspergillus nidulans

Mut. Res. 46 (1977), 395-402

Brendel, M., A. Ruhland :

Relationships between functionality and genetic toxicology
of selected DNA-damaging agents

Mut. Res. 133 (1984), 51-85

Brusick, D., H. Andrews :

Comparison of the genetic activity of dimethylnitrosamine,
ethylmethanesulfonate, 2-acetylaminofluorene and ICR-170
in *Saccharomyces cerevisiae* strains D3, D4 and D5 using in

vitro assays with and without metabolic cativation
Mut. Res. 26 (1974), 491-500

Burnotte, J., W.G. Verly :
A kinetic approach to the mechanism of deoxyribonucleic
acid cross-linking by HNO_2
The J. Biol. Chem. 246 (1971), 5914-5918

Catt, J.W. :
The isolation and chemical composition of the zygospor
cell wall of Chlamydomonas reinhardtii
Plant Sci. Lett. 15 (1979), 69-74

Cavalier-Smith, T. :
Electron microscopy of zygospor formation in Chlamy-
domonas reinhardtii
Protoplasma 87 (1976), 297-315

Cerdá-Olmedo, E., P.C. Hanawalt :
Macromolecular action of nitrosoguanidine in E. coli
Biochim. Biophys. Acta 142 (1967), 450-464

Chandler, J.L.R. :
The chemical dynamics of mutagenesis and carcinogenesis
I. A chemical-kinetic model of dose-response relationships
Mut. Res. 25 (1974), 169-178

Chiang, K.S., J.R. Kates, R.F. Jones, N. Sueoka :
On the formation of a homogenous zygotic population
in Chlamydomonas reinhardtii
Dev. Biology 22 (1970), 655-669

Chiu, S.M., P.J. Hastings :

Pre-meiotic DNA synthesis and recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Genetics 73 (1973), 29-43

Cox, B.S. :

Recombination and repair in simple eucaryotes

in: DNA Repair Mechanisms, Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C., Fox, C.F. (eds.), Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978, 429-435

Craddock, V.M., P.N. Magee :

Reaction of the carcinogen dimethylnitrosamine with nucleic acids in vitro

Biochem. J. 89 (1963), 32-37

Davies, D.R. :

The comparative effects of a mono- and a bifunctional alkylating agent on recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Z. Vererbungsl. 98 (1966), 61-70

Davies, D.R., C.W. Lawrence :

The mechanism of recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*
II. Influence of inhibitors of DNA synthesis on intergenic recombination

Mut. Res. 4 (1967), 147-154

Davies, P.J., W.E. Evans, J.M. Parry :

Mitotic recombination induced by chemical and physical agents in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Mut. Res. 29 (1975), 301-314

Dean, B.J., P. Hodges :

Short-term tests for genotoxicity

in: Proceedings of the Frame Symposium on "Animals
and Alternatives in Safety Evaluation", London 1982

Degraeve, N. :

Search for mutagenic activity of the alkaloid vinblastine
Mut. Res. 21 (1973), 28

De Kok, A.J., P. de Knijff, G.R. Mohn :

Correlation between the stability of ethyl nitrosoourea
in aqueous solution at different pH and temperature and
its mutagenic effectiveness for *Salmonella typhimurium*
strain TA 100

Mut. Res. 120 (1983), 81-89

De Serres, F.J., H.V. Malling :

Measurement of recessive lethal damage over the entire
genome and at two specific loci in the *ad-3* region of
Neurospora crassa with a two component heterokaryon
in: Chemical Mutagens, Vol. 2, Hollaender, A. (ed.),
Plenum Press, New York, London, 1971, 311-341

Druckerey, H., R. Preussmann, S. Ivankovic, D. Schmahl :
Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen
Nitrosoverbindungen an BD-Ratten

Z. Krebsforsch. 69 (1967), 103-201

Ebersold, W.T. :

Crossing-over in *Chlamydomonas reinhardtii*

Am. J. Botany 43 (1956), 408-410

Ebersold, W.T., R.P. Levine :

A genetic analysis of linkage group I of *Chlamydomonas reinhardi*

Z. Vererbungsl. 90 (1959), 74-82

Ellenberger, J., G. Mohn :

Mutagenic activity of cyclophosphamide, isofosfamide and trofosfamide in different genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* after biotransformation through extract of rodent liver

Arch. Toxicol. 33 (1975), 225-240

Eversole, R.A. :

Crossover frequency studies with biochemical mutants of *Chlamydomonas*

Doct. Diss., Series Publ. No. 16,021 (1956)

Fahrig, R. :

Metabolic activation of mutagens in mammals-host-mediated assay utilizing the induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*

in: Agents and actions, Vol. III, Birkhäuser Verlag, Basel, 1973a, 99-110

Fahrig, R. :

Experiments with the host-mediated assay utilizing induction of mitotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*

Mut. Res. 21 (1973b), 30

Fahrig, R. :

The effect of dose and time on the induction of genetic alternations in *Saccharomyces cerevisiae* by aminoacridines in the presence and absence of visible light irradiation

in comparison with dose-effect-curves of mutagens with other type of action

Mol. Gen. Genet. 144 (1976), 131-140

Fahrig, R. :

Evidence that induction and suppression of mutations and recombinations by chemical mutagens in *Saccharomyces cerevisiae* during mitosis are jointly correlated

Mol. Gen. Genet. 168 (1979), 125-139

Fahrig, R. :

About the mechanism of sister chromatid exchange in: Sister-Chromatid-Exchange Test, Workshop GUM 1980, Müller, D. (ed.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1982, 20-30

Fahrig, R. :

Genetic mode of action of cocarcinogens and tumor promoters in yeast and mice

Mol. Gen. Genet. 194 (1984), 7-14

Fleer, R., A. Ruhland, M. Brendel :

The cytotoxic action of activated and non-activated cyclophosphamide in yeast: comparison of induced DNA damage

Chem.-Biol. Interact. 42 (1982), 67-78

Fox, M., D. Scott :

The genetic toxicology of nitrogen and sulphur mustard

Mut. Res. 75 (1980), 131-168

Freese, E. :

Molecular mechanism of mutation

in: Chemical Mutagens, Vol.1, Hollaender, A. (ed.),

Plenum Press, New York, 1971, 1-56

Game, J.C., T.J. Zamb, R.J. Braun, M.A. Resnick, R.M. Roth :

The role of radiation (rad) genes in meiotic recombination in yeast

Genetics 94 (1980), 51-68

Gatehouse, D. :

Detection of mutagenic derivatives of cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a "microtitre"^R fluctuation test without microsomal activation

Mut. Res. 53 (1978), 289-296

Gebhard, E. :

Chemische Mutagenese

G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1977

Gichner, T., J. Veleminsky, A.G. Udenbrink :

Induction of somatic mutations by the promutagen dimethylnitrosamine in hairs of Tradescantia stamen

Mut. Res. 78 (1980), 381-384

Gichner, T., J. Veleminsky :

Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs

Mut. Res. 99 (1982), 129-242

Gichner, T., J. Veleminsky, K. Pankova :

Differential response to three alkylating nitroso-compounds and three agricultural chemicals in the Salmonella (Ames) and in the Tradescantia, Arabidopsis and Barley mutagenicity assays

Biol. Zentralbl. 101 (1982), 375-383

Gichner, T., J. Veleminsky :

Inhibition of dimethylnitrosamine induced mutagenesis
in *Arabidopsis thaliana* by diethyldithiocarbamate
and carbonmonoxide

Mut. Res. 139 (1984), 29-33

Gillham, N.W. :

Induction of chromosomal and nonchromosomal mutations
in *Chlamydomonas reinhardtii* with N-methyl-N'-nitro-
N-nitrosoguanidine

Genetics 52 (1965), 529-537

Gletten, F., U. Weekes, D. Brusick :

In vitro metabolic activation of chemical mutagens.

I. Development of an in vitro mutagenicity assay using
liver microsomal enzymes for the activation of di-
methylnitrosamine to a mutagen

Mut. Res. 28 (1975), 113-122

Graf, U., F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon,
C.B. Hall, P.G. Kale :

Somatic mutation and recombination test with *Drosophila*
melanogaster

Env. Mutagenesis 6 (1984), 153-188

Günther, E. :

Grundriß der Genetik

G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 3. Aufl., 1978

Guttenplan, J.B., S. Milstein :

On the effects of pH on mutagenesis induced by N-nitroso-
compounds

Mut. Res. 93 (1982), 249-250

Hales, B.F. :

Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites 4-hydroxycyclophosphamide, phosphoramidate mustard and acrolein
Cancer Res. 42 (1982), 3016-3021

Harm, W. :

Analysis of photoenzymatic repair of UV-lesions in DNA by single light flashes. VIII. Inhibition of photoenzymatic repair of UV-lesions in E. coli DNA by caffeine

Mut. Res. 10 (1970), 319-333

Hawks, B.G., R.W. Lee :

Methyl methanesulfonate mutagenesis of synchronized Chlamydomonas

Mut. Res. 37 (1976), 221-228

Holliday, R. :

The induction of mitotic recombination by mitomycin C in Ustilago and Saccharomyces

Genetics 50 (1964), 323-335

Hollstein, M., J. McCann :

Short-term tests for carcinogens and mutagens

Mut. Res. 65 (1979), 133-226

Howard-Flanders, P. :

Inducible repair of DNA

Scientific American 245 (1981), 72-80

Howard-Flanders, P., S.C. West, S. Andrzej :

Role of rec A protein spiral filaments in genetic recombination

Nature 309 (1984), 215-220

Hudock, G.A., H. Rosen :

Formal genetics of *Chlamydomonas reinhardi*

in: The Genetics of Algae, Levine, R.A. (ed.), Botanical Monographs, Vol. 12, Blackwell Scientific Publications, 1976, 29-48

Kates, J.R., R.F. Jones :

The control of gametic differentiation in liquid cultures of *Chlamydomonas*

Cell Comp. Physiol. 63 (1964), 157-164

Kaufmann, H. :

Grundlagen der organischen Chemie

UTB, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart, 1974

Kelly, S.L., J.M. Parry :

The induction of mutation and recombination following UV irradiation during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*

Mut. Res. 108 (1983), 109-120

Kelly, S.L., R.S. Tippins, J.M. Parry, R. Waters :

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine induced genetic change during the meiotic cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: an absence of S-phase specificity

Carcinogenesis 4 (1983), 851-856

Kihlman, B.A. :

Cytological effects of phenylnitrosamines. III. The effect on X-ray sensitivity at low oxygen tensions

Rad. Bot. 1 (1961), 51-60

Knox, P. :

Carcinogenic nitrosamides and cell cultures
Nature 259 (1976), 671-673

Kokontis, J.M., E.D. Garber :

Spontaneous and induced mitotic recombination in
Ustilago violaceae detected at the cellular level
Curr. Genet. 7 (1983), 465-471

Kreyszig, E. :

Statistische Methoden und ihre Anwendungen
Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, 1975

Kriek, E., P. Emmelot :

Methylation of deoxyribonucleic acid by diazomethan
Biochim. Biophys. Acta 91 (1964), 59-66

Kunz, B.A., R.H. Haynes :

Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast
Ann. Rev. Genet. 15 (1981), 57-89

Langenbach, R., S. Nesnow, A. Tompa, R. Gingell, C.
Kuszynski :

Lung and liver cell mutagenesis systems: specificities
in the activation of chemical carcinogens
Carcinogenesis 2 (1981), 851-858

Lawley, P.D. :

Methylation of DNA by N-methyl-N-nitroso-N'-nitroguanidine
Nature 218 (1968), 580-581

Lawley, P.D. :

Some aspects of dose-response relationships in alkylation
mutagenesis
Mut. Res. 23 (1974), 283-295

Lawrence, C.W. :

Influence of non-lethal doses of radiation on recombination
in *Chlamydomonas reinhardtii*

Nature 206 (1965a), 789-791

Lawrence, C.W. :

The effect of dose duration in the influence of irradiation on recombination in *Chlamydomonas*

Mut. Res. 2 (1965b), 487-493

Lawrence C.W. :

Influence of non-lethal doses of radiation on recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Genet. Res. 9 (1967), 123-127

Lawrence C.W., D.R. Davies :

The mechanism of recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. The influence of inhibitors of protein synthesis on intergenic recombination

Mut. Res. 4 (1967), 137-146

Lawrence, C.W. :

Dose dependence for radiation-induced allelic recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Mut. Res. 10 (1970), 557-566

Lawrence, C.W., P.D. Holt :

Effect of γ -irradiation and α -particles on recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Mut. Res. 10 (1970), 545-555

Levine, R.P., W.T. Ebersold :

Gene recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*

Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 23 (1958), 101-109

Levine, R.P., W.T. Ebersold :

The genetics and cytology of *Chlamydomonas*
Ann. Rev. Microbiol. 14 (1960), 197-216

Levine, R.P. :

Genetik

BLV, München, Basel, Wien, 1966

Lewin, R.A. :

The zygote of *Chlamydomonas moewusii*
Canad. J. Bot. 35 (1957), 795-804

Lieb, M. :

Enhancement of ultraviolet-induced mutation in bacteria
by caffeine

Z. Vererbungsl. 92 (1961), 416-429

Loppes, R. :

Damage induced by methyl methanesulfonate (MMS) in
Chlamydomonas reinhardi

Z. Vererbungsl. 98 (1966), 193-202

Loppes, R. :

Ethyl methanesulfonate: an effective mutagen in
Chlamydomonas reinhardi

Mol. Gen. Genet. 102 (1968), 229-231

Loppes, R. :

A new class of arginine-requiring mutants of *Chlamy-*
domonas reinhardi

Mol. Gen. Genet. 104 (1969a), 172-177

Loppes, R. :

Effect of the selective medium on the manifestation

of mutations induced with mono-alkylating agents in
Chlamydomonas reinhardtii

Mut. Res. 7 (1969b), 25-34

Loprieno, N. :

Differential response of *Schizosaccharomyces pombe* to
ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate

Mut. Res. 3 (1966), 486-493

Loprieno, N., R. Barale, C. Bauer, S. Baroncelli, G.
Bronzetti, A. Cammellini, A. Cinci, G. Corsi, G. Lepo-
rini, R. Nieri, M. Nozzolini, C. Serra :

The use of different test systems with yeasts for the
evaluation of chemically induced gene conversions and
gene mutations

Mut. Res. 25 (1974), 197-217

MacGregor, J.T., L.E. Sacks :

The sporulation system of *Bacillus subtilis* as the
basis of a multigene mutagen test system

Mut. Res. 36 (1976), 271-286

Machida, I., S. Nakai :

Differential effects of UV irradiation on induction
of intragenic and intergenic recombination during
commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*

Mut. Res. 73 (1980), 69-80

Madle, S., G. Obe :

Methods for analysis of the mutagenicity of indirect
mutagens/carcinogens in eukaryotic cells

Hum. Genet. 56 (1980), 7-20

Mahna, S.K, H.J. Rhaese :

Transfection assay: a new test for studying
mutation induction

Experientia 39 (1983), 530-532

Malling, H.V. :

Mutagenicity of two potent carcinogens, dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in *Neurospora crassa*

Mut. Res. 3 (1966), 537-540

Malling, H.V. :

Mutagenic activation of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine in the host-mediated assay and the microsomal systems

Mut. Res. 26 (1974), 465-472

Mandell, J.D., J. Greenberg :

A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine

Biochem. Biophys. Res. Comm. 3 (1960), 575-577

Margison, G.P., P.J. O'Connor :

Nucleic acid modification by N-nitrosocompounds
in: Chemical Carcinogens and DNA, Grover, P.L. (ed.),
CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, 1979, 112-159

Martin, N.C., U.W. Goodenough :

Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*
I. Production of gametes and their fine structure

The J. Cell Biol. 67 (1975), 587-605

Mayer, V.W. :

Mutagenicity of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine for *Saccharomyces* in an in vitro hydroxylation

system

Mol. Gen. Genet. 112 (1971), 289-294

Mayer, C.W. :

Induction of mitotic crossing-over in *Saccharomyces cerevisiae* by breakdown products of dimethylnitrosamine, 1-naphtylamine and 2-naphtylamine formed by an in vitro hydroxylation system

Genetics 74 (1973), 433-442

Mayer, C.W., C.J. Hybner, D.J. Brusick :

Genetic effects induced in *Saccharomyces cerevisiae* by cyclophosphamide in vitro without liver enzyme preparation

Mut. Res. 37 (1976), 201-212

Mendoza-Figuera, T., R. Lopez-Revilla, S. Villa-Trevino :

DNA breaks induced by micromolar concentrations of dimethylnitrosamine in liver primary cell cultures from untreated and phenobarbital treated rats

Toxicology 27 (1983), 55-69

Michaelis, A., R. Rieger :

Die Induktion von Chromosomenaberrationen durch Mitomen und Endoxan und der Transportform-Wirkform-Mechanismus

Biol. Zentralbl. 80 (1961), 301-317

Mohn, G.R., J. Ellenberger, P.J. van Bladeren :

Evaluation and relevance of *Escherichia coli* test systems for detecting and for characterizing chemical carcinogens and mutagens

in: Applied Methods in Oncology, Vol. 3, Williams, G.M. (ed.), Biomedical Press, Amsterdam, 1980, 27-41

Mortimer, Ch. E. :

Chemie

Thieme Verlag, Stuttgart, 1973

Mutschler, E. :

Arzneimittelwirkungen

Wissensch. Verlagsgesellsch. mbH, Stuttgart, 4. Aufl.,
1981

Neale, S. :

Effect of pH and temperature on nitrosamide-induced
mutation in *E. coli*

Mut. Res. 14 (1972), 155-164

Neale, S. :

Mutagenicity of nitrosamides and nitrosamines in micro-
organisms and plants

Mut. Res. 32 (1976), 229-266

Niemann, E.G. :

Strahlenbiophysik

in: Biophysik, Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Zieg-
ler (eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New
York, 1982, 300-312

Nilan, R.A., B.K. Vig :

Plant test systems for detection of chemical mutagens

in: Chemical Mutagens, Vol.4, De Serres F.J., Hollaen-
der, A. (eds.), Plenum Press, New York, 1976, 143-170

O'Brien, S.J. :

Genetic Maps 2

Lab of Viral Carcinogenesis NCI, NHI, Frederick, 1982

Organikum

VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 12.
Aufl., 1973

Ostermann-Golkar, S. :

Reaction kinetics of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
Mut. Res. 24 (1974), 219-226

Pasternak, L. :

Mutagene Wirkung von Dimethylnitrosamin bei Drosophila melanogaster
Naturwissensch. 49 (1962), 381

Portney, M.D., H. Rosen :

The effect of caffeine on repair in Chlamydomonas reinhardtii II. Interaction of repair systems
Mut. Res. 70 (1980), 311-321

Preussmann, R. :

Zum oxidativen Abbau von Nitrosaminen mit enzymfreien Modellsystemen
Arzneimittel-Forsch. 14 (1964), 769-774

Prival, M.J., V.D. King, A.T. Sheldon jr. :

The mutagenicity of dialkyl nitrosamines in the Salmonella plate assay
Env. Mutag. 1 (1979), 95-104

Putrament, A., H. Baranowska, T. Bilinski, W. Prazmo :

On the specificity of caffeine-effects
Mol. Gen. Genet. 118 (1972), 373-379

Ranneberg, H., C.G. Arnold :

Die Wirkung von Äthylmethansulfonat auf *Chlamydomonas reinhardi*

Mol. Gen. Genet. 101 (1968), 212-216

Rhaese, H.J., E. Freese :

Chemical analysis of DNA alternations. I. Base liberation and backbone breakage of DNA and oligodeoxynucleic acid induced by hydrogenperoxide and hydroxylamine

Biochim. Biophys. Acta 155 (1968), 476-490

Rich, P.R., D.S. Bendall :

Cytochrome components of plant microsomes

Eur. J. Biochem. 55 (1975), 333-341

Robisch, G. :

Der Einfluß von Cycloheximid und Coffein auf den nach 8-MOP plus UV-A-Behandlung auftretenden Dunkelrepair in einer argininbedürftigen Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii*

Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg, 1981

Roper, J.A. :

Aspergillus nidulans

in: Chemical Mutagens, Vol. 2, De Serres, F.J., Hollaender, A. (eds.), Plenum Press, New York, London, 1971, 343-363

Rosen, H., W.T. Ebersold :

Recombination in relation to UV-sensitivity in *Chlamydomonas reinhardtii*

Genetics 71 (1972), 247-253

Rosen, H., M.M. Rehn, B.A. Johnson :

The effect of caffeine on *Chlamydomonas reinhardtii*

I. Enhancement of recombination repair

Mut. Res. 70 (1980), 301-309

Sager, R., S. Granick :

Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*

J. Gen. Physiol. 37 (1954), 729-742

Sager, R. :

Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

Genetics 40 (1955), 476-489

Schimmer, O., R. Loppes :

Forward mutation induced by nitrosoguanidine during the synchronized cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*

Mol. Gen. Genet. 138 (1975), 25-31

Schimmer, O. :

Schnelltest auf die mutagene Wirkung von Arzneistoffen mit Hilfe eines Algentestsystems

Dtsch. Apotheker-Zeit. 117b (1977), 203-206

Schimmer, O., G. Hauber :

Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in *Chlamydomonas*. I. Der Einfluß von Licht verschiedener Wellenlängenbereiche auf die Mutationsinduktion durch Xanthotoxin in einer argininbedürftigen Mutante

Mut. Res. 44 (1977), 21-31

Schimmer, O. :

Phototoxizität und Photomutagenität von Furocumarinen

und Furocumarindrogen bei *Chlamydomonas reinhardtii*
Planta medica 40 (1980), 68-76

Seel, F. :

Grundlagen der analytischen Chemie

Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 5. Aufl., 1970

Singer, B., J.T. Kusmierek:

Chemical mutagenesis

Ann. Rev. Biochem. 52 (1982), 655-693

Smith, G.J., J.W. Grisham :

Cytotoxicity of monofunctional alkylating agents
methylmethanesulfonate and methyl-N'-nitro-N-nitroso-
guanidine have different mechanisms of toxicity for
10 T1/2 cells

Mut. Res. 111 (1983), 405-417

Strijkert, P.J., J.S. Sussenbach :

Arginine metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Evi-
dence for a specific regulatory mechanism of the bio-
synthesis

Eur. J. Biochem. 8 (1969), 408-412

Sueoka, N., K.S. Chiang, J.R. Kates :

Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of
Chlamydomonas reinhardtii

J. Mol. Biol. 25 (1967), 47-66

Sugimura, T., S. Fujimura, M. Nagao, T. Yokoshima,
M. Hasegawa :

Reaction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine with
protein

Biochim. Biophys. Acta 170 (1968), 427-429

Sutshi, U., B.L. Kaul :

Induction of chromosomal breaks by nitrosodimethyl-
amine and its homologs in barley, *Hordeum vulgare*
Indian. J. Biol. 10 (1973), 152-153

Swain, C.G., C.B. Scott :

Quantitative correlation of relative rates. Comparison
of hydroxide ion with other nucleophilic reagents to-
wards alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides
J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953), 141-147

Sweet, J.M., B. Carda, G.D. Small :

Repair of 3-methylguanine and 7-methylguanine in nuclear
DNA of *Chlamydomonas*. Requirement of protein synthesis
Mut. Res. 84 (1981), 73-82

Theiß, I., A. Basler, G. Röhrborn :

Untersuchungen zur mutagenen Wirkung von Äthylnitroso-
harnstoff an Nagern und Primaten
Forsch. Ber. d. Landes NRW, Nr. 3121/Fachgr. Medizin
Westdeutscher Verlag 1982

Thornton, R.J., J.R. Johnston :

Rates of spontaneous mitotic recombination in *Saccha-
romyces cerevisiae*
Genet. Res. 18 (1971), 147-151

Tschäpe, H. :

Herstellung und Tetradenanalyse von Algenmutanten mit
verschiedenen Mutagenen
Diplomarbeit, Universität Greifswald, 1966

Turtoczky, I., L. Ehrenberg :

Reaction rates and biological action of alkylating agents:
Preliminary report of bactericidal and mutagenic action
in *E. coli*

Mut. Res. 10 (1970), 169-174

Veleminsky, J., T. Gichner :

The mutagenic activity of nitrosamines in *Arabidopsis thaliana*

Mut. Res. 5 (1968), 429-431

Veleminsky, J., T. Gichner :

Two types of dose-response curve in *Arabidopsis thaliana*

Mut. Res. 12 (1971), 65-70

Vogel, E., A.T. Natarajan :

The relation between reaction kinetics and mutagenic
action of monofunctional alkylating agents in higher
eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and
translocations in *Drosophila*

Mut. Res. 62 (1979), 51-123

Vogel, E., A.T. Natarajan :

The relation between reaction kinetics and mutagenic
action of monofunctional alkylating agents in higher
eukaryotic systems: interspecies comparisons
in: Chemical Mutagens, Vol. 7, De Serres, F.J., Hollaender,
A. (eds.), Plenum Press, New York, London, 1982,
295-336

Wasmuth, J.J., L. Vock Hall

Genetic demonstration of mitotic recombination in
cultured chinese hamster cell hybrid

Cell 36 (1984), 697-707

Yamamoto, K., H. Yamaguchi :

Inhibition by caffeine of the repair of γ -ray-induced chromosome breaks in barley

Mut. Res. 8 (1969), 428-430

Yost, H.T., R.S. Chaleff, J.P. Finerty :

Induction of mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae* by EMS

Nature 215 (1967), 660-661

Zimmermann, F.K., R. Schwaier, U.v. Laer :

Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic alkylating nitrosamides

Z. Vererbungsl. 98 (1966), 230-246

Zimmermann, F.K., U.v. Laer :

Induction of mitotic recombination with ethyleneimine in *Saccharomyces cerevisiae*

Mut. Res. 4 (1967), 377-379

Zimmermann, F.K., R. Schwaier :

Induction of mitotic gene conversion with nitrous acid, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine and other alkylating agents in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol. Gen. Genet. 100 (1967), 63-76

Zimmermann, F.K. :

Induction of mitotic gene conversion by mutagens

Mut. Res. 11 (1971), 327-337

Zimmermann, F.K. :

Detection of genetically active chemicals using various

yeast systems

in: Chemical Mutagens, Vol. 3, Hollaender, A. (ed.),
Plenum Press, New York, 1973, 209-258

Zimmermann, F.K., R. Kern, H. Rasenberger :

A yeast strain for simultaneous detection of induced
mitotic crossing over, mitotic gene conversion and
reverse mutation

Mut. Res. 28 (1975), 381-388

Zuk, J., Z. Swietlinska :

Effect of caffeine on nucleic acids and protein synthesis
in *Vicia faba*

Mut. Res. 17 (1973), 207-212

Lebenslauf

17. 02. 1957 geboren in Göttingen
 Vater: Dr. Gerd August Waechter
 Mutter: Allmut Waechter, geb. v. Büнау

1963 - 1967 Besuch der Volksschule Aplerbecker
 Mark in Dortmund

1967 - 1970 Besuch des Goethe-Gymnasiums in
 Dortmund

1970 - 1975 Besuch des Gymnasiums Lünen-Altlinen
 in Lünen/Westf.

02. 06. 1975 Abitur

01. 10. 1975 Immatrikulation an der Georg-August-
 Universität, Göttingen
 Studienfach: Biologie

17. 10. 1977 Diplom-Biologen-Vorprüfung

13. 10. 1979 Diplom-Biologen-Hauptprüfung

1979 - 1980 Anfertigung der Diplomarbeit
 Thema: Moorkundliche Untersuchungen
 an Kolken und Schlenken im Oberharz

seit 1980 verheiratet mit Dr. F. Walter Preidel

30. 09. 1980 Exmatrikulation an der Georg-August-
 Universität, Göttingen

01. 10. 1980 Immatrikulation an der Friedrich-
 Alexander-Universität, Erlangen-
 Nürnberg; Promotionsstudium

seit Okt. 1982 wissenschaftliche Mitarbeiterin
 am Institut für Botanik und Phar-
 mazeutische Biologie



